FERNANDO RAMON ZILINSKI

**Avaliação da expressão e função de PD-1 e seu ligante PD-L1 nas
subpopulações de linfócitos B em pacientes com Imunodeficiência
Comum Variável (ICV) com manifestações gastrointestinais**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Alergia e
Imunopatologia
Orientadora: Dra. Cristina Maria
Kokron

(Versão corrigida. Resolução CoPGr6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2021

FERNANDO RAMON ZILINSKI

**Avaliação da expressão e função de PD-1 e seu ligante PD-L1 nas
subpopulações de linfócitos B em pacientes com Imunodeficiência
Comum Variável (ICV) com manifestações gastrointestinais**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Alergia e
Imunopatologia
Orientadora: Dra. Cristina Maria
Kokron

(Versão corrigida. Resolução CoPGr6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Zilinski, Fernando Ramon

Avaliação da expressão e função de PD-1 e seu
ligante PD-L1 nas subpopulações de linfócitos B em
pacientes com Imunodeficiências Comum Variável
(ICV) com manifestações gastrointestinais / Fernando
Ramon Zilinski. -- São Paulo, 2021.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Alergia e Imunopatologia.
Orientadora: Cristina Maria Kokron.

Descritores: 1.Imunodeficiência comum variável
2.Subpopulações de linfócitos B 3.Linfócitos B
4.Gastroenteropatias 5.Citometria de fluxo

USP/FM/DBD-062/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

**Dedico esta dissertação à minha mãe por todo carinho, apoio e torcida
pelo meu sucesso.**

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me guiar sempre que me encontro em situações de incertezas;

À minha orientadora, Dra. Cristina Maria Kokron, por todos os ensinamentos compartilhados durante todos esses anos e pela oportunidade de realizar pesquisa em uma área tão importante quanto Imunologia;

À minha amiga e colega de laboratório Bianca Almeida Natali Dos Santos, por tudo que me ensinou, pela amizade e companheirismo demonstrados desde quando era aprimorando, sendo essencial para a realização deste mestrado.

À minha amiga Juliana de Souza Apostolico, por todo suporte durante mestrado, sendo essencial para realização deste mestrado.

Aos funcionários e colaboradores do LIM-60, em especial à Ana Karolina Barreto, Erica Martins Coutinho, Milena Mary de Souza Andrade, Priscilla Ramos Costa e Ruth Bonadia por todos os ensinamentos, apoio e auxílio durante todo meu mestrado;

Aos funcionários do Ambulatório de Imunologia Clínica e Alergia, em especial à Rosana Viera Coutinho e Serafim Fidalgo, pela cooperação e apoio junto aos pacientes;

À minha família e amigos, por serem minha base e por todo apoio demonstrado durante o desenvolvimento deste trabalho, em especial à Fernanda por toda paciência e compreensão durante essa fase final de mestrado.

Ao INCT – Instituto de Investigação em Imunologia e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro

E principalmente aos pacientes, pela confiança em nosso trabalho e pela imensa contribuição para a pesquisa.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	24
1.1. Imunodeficiência comum variável (ICV)	24
1.2. Manifestações gastrointestinais na ICV	32
1.3. LB e a Imunodeficiência comum variável	36
1.4. Linfócito T folicular (LT _{FH}) e via PD-1/PD-L1	38
2. JUSTIFICATIVA	43
4. OBJETIVOS	45
4.1. <i>Objetivo Geral:</i>	45
4.1.1. <i>Objetivos Específicos:</i>	45
5. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS	46
5.1. <i>Desenho do Estudo</i>	46
5.2. <i>Locais do estudo</i>	46
5.3. <i>Casuística</i>	46
5.4. <i>Recrutamento</i>	47
5.4.1. <i>Seleção e avaliação dos pacientes</i>	47
5.4.2. <i>Coleta das amostras</i>	48
5.5. <i>Imunofenotipagem de superfície celular em células mononucleares do sangue periférico</i>	50
5.6. <i>Análise de citometria</i>	59
5.7. <i>Exames laboratoriais</i>	59
5.8. <i>Análise estatística</i>	59
5.9. <i>Aspectos éticos</i>	60
6. RESULTADOS	61

6.1.	Dados Demográficos, clínicos e laboratoriais	61
6.2.	Avaliação da frequência de linfócitos B e suas subpopulações em células mononucleares do sangue periférico, e expressão de PD-1 e PD-L1	64
6.3.	Frequências de linfócitos T foliculares (T_{FH}) em células mononucleares do sangue periférico.	100
7.	DISCUSSÃO	104
8.	CONCLUSÕES	116
9.	ANEXOS	117
10.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

%	Porcentagem
ACD	Ácido Cítrico, Citrato de Sódio e Dextrose
APC	Alofococianina
BAFF	Fator de ativação de célula B
BAFFR	Receptor do fator de ativação de célula B
BCL-6	proteína 6 de linfoma de células B
BCR	Receptor de linfócito B
Bregs	Linfócitos B reguladores
BTLA	Atenuador de Linfócito B e T
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CD	Designação de grupos
CVID	<i>Common Variable Immune Deficiency</i>
CMSP	Células Mononucleares do Sangue Periférico
CMV	Citomegalovírus
CTLA-4	Proteína 4 associada a Linfócito T Citotóxico
CXCR5	Receptor de quimiocina do motivo C-X-C tipo 5
DC	Células dendríticas
DMSO	Dimetil-sufóxido
EII	Erros Inatos da Imunidade
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
<i>et al.</i>	E outros
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FSC	<i>Forward Scatter</i> – dispersão frontal da luz que mede altura
FSC-A	<i>Forward Scatter</i> – dispersão frontal da luz que mede área
FSC-H	<i>Forward Scatter</i> – dispersão frontal da luz que mede altura
GC	Centro germinativo
GI	Gastrointestinal
HC	Hospital das Clínicas
HNL	Hiperplasia Nodular Linfoide

HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
ICOS	Co-Estimulador Indutível
ICV	Imunodeficiência Comum Variável
IDPs	Imunodeficiências primárias
Ig	Imunoglobulina
IgAD	Deficiência seletiva de Imunoglobulina A
IGIV	Imunoglobulina Intravenosa
IL	Interleucina
IL-R	Receptor de interleucina
IFN- γ	Interferon Gama
ITIM	<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motiff</i>
LB	Linfócito B
LB _{FH}	Linfócito B <i>helper</i> folicular
LT	Linfócito T
LT _{FH}	Linfócito T <i>helper</i> folicular
LT _{FHreg}	Linfócito T <i>helper</i> folicular regulador
LIM60	Laboratório de Investigação Médica 60
mL	Mililitro
μ L	Micro litro
MO	Medula óssea
MZB	Células B de zona marginal
NFKB1	Fator-Kappa nuclear humano B1
NFKB2	Fator-Kappa nuclear humano B2
ng	Nanograma
°C	Grau centígrado
PBL	Plasmoblastos
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Proteína C Reativa
PD-1	Marcador de Morte Programada-1
PD-L1	Ligante 1 do Marcador de Morte Programada – 1
PD-L2	Ligante 2 do Marcador de Morte Programada – 2
PE	Ficoeritrina
PerCP	Proteína clorofilperidina

PFA	Paraformaldeído
PIK3CD	Fosfatidilinositol – 4,5-Bifosfato 3 – Quinase catalítica Delta, gene codificante
PLCG2	<i>Phospholipase C Gamma 2</i> proteína codificante
PRÓ-B	Células B progenitoras
PRÉ-B	Células precursoras de células B
R10	Meio RPMI suplementado com 10% SFB
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Meio de Cultura para células desenvolvido pelo Instituto <i>Roswell Park Memorial</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SSC	<i>Side Scater</i> – dispersão lateral da luz
TACI	<i>Transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
TNF	Fator de necrose tumoral
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TGI	Trato gastrointestinal
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
Treg	Linfócito T regulador
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
XLA	Agamaglobulinemia Ligada ao Cromossomo X

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Manifestações clínicas da ICV nos pacientes acompanhados no complexo HC-FMUSP, 2019 (n=180).....	26
Figura 2: Desenvolvimento e diferenciação de células B.....	37
Figura 3: Co-receptores.	39
Figura 4: Efeito da Via PD-1/PD-L1.	41
Figura 5: Estratégia para análise da expressão das moléculas de linfócitos B.....	55
Figura 6: Estratégia de análise para avaliar a co-expressão das moléculas PD-1 e PD-L1 nas subpopulações de linfócitos B.....	56
Figura 7: Estratégia para análise da expressão das moléculas de linfócitos T _{FH}	58
Figura 8: Porcentagem das células CD19 ⁺ (linfócitos B) em CMSP de pacientes ICV com complicações gastrointestinais (ICV-GI) e sem complicações (ICV-S/C) em comparação com indivíduos CTRL.....	65
Figura 9: Porcentagem das células CD19 ⁺ (linfócitos B) em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV com complicações gastrointestinais (ICV-GI) em comparação com indivíduos CTRL.....	66
Figura 10: Porcentagem das linfócitos B (CD19 ⁺) com expressão de PD-1 em CMSP de pacientes ICV com complicações gastrointestinais (ICV-GI) e sem complicações (ICV-S/C) em comparação com indivíduos CTRL.....	67
Figura 11: Porcentagem das linfócitos B (CD19 ⁺) com expressão de PD-1 nos	68

diferentes subgrupos de pacientes ICV com complicações gastrointestinais (ICV-GI) em comparação com indivíduos CTRL.....

Figura 12: Porcentagem de PD-L1 em linfócitos B (CD19⁺) em CMSP de 69
pacientes ICV com complicações gastrointestinais (ICV-GI) e sem complicações
(ICV-S/C) em comparação com indivíduos CTRL.....

Figura 13: Porcentagem das células CD19⁺ (linfócitos B) com expressão de PD- 70
L1 em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV com complicações
gastrointestinais (ICV-GI) em comparação com indivíduos.....

Figura 14: Porcentagem de linfócito B Transicional (CD19+CD24+CD38+) em 71
CMSP de pacientes ICV com complicação gastrointestinal (ICV-GI) e sem
complicações (ICV-SC) em comparação com indivíduos CTRL.....

Figura 15: Porcentagem de linfócito B Transicional (CD19+CD24+CD38+) em 72
CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV com complicação
gastrointestinal em comparação a indivíduos CTRL.....

Figura 16: Porcentagem de linfócitos B transicional (CD19+CD24+CD38+) com 73
expressão de PD-1 em CMSP de pacientes ICV com complicação gastrointestinal
(ICV-GI) e sem complicações (ICV-SC) em comparação com indivíduos CTRL....

Figura 17: Porcentagem de linfócitos B Transicional (CD19+CD24+CD38+) com 73
expressão de PD-1 em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV com
complicação gastrointestinal em comparação a indivíduos CTRL.....

Figura 18: Porcentagem de linfócitos B transicional (CD19+CD24+CD38+) com 74
expressão de PD-L1 em CMSP de pacientes ICV com complicação gastrointestinal
(ICV-GI) e sem complicações (ICV-SC) em comparação com indivíduos CTRL.....

Figura 19: Porcentagem de Linfócitos B Naïve (CD19+CD20+IgD+CD27-) em

CMSP de pacientes ICV com complicação gastrointestinal (ICV-GI) e sem complicações (ICV-SC) em comparação com indivíduos CTRL.....	75
Figura 20: Porcentagem de Linfócito B Naïve (CD19+CD20+IgD+CD27-) em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV com complicação gastrointestinal em comparação a indivíduos CTRL.....	76
Figura 21: Porcentagem de Linfócitos B Naïve (CD19+CD20+IgD+CD27-) com expressão de PD-1 em CMSP de pacientes ICV com complicação gastrointestinal (ICV-GI) e sem complicações (ICV-SC) em comparação com indivíduos CTRL.....	77
Figura 22: Porcentagem de Linfócito B Naïve (CD19+CD20+IgD+CD27-) com expressão de PD-1 em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV com complicação gastrointestinal em comparação a indivíduos CTRL.....	78
Figura 23: Porcentagem de linfócitos B Naïve (CD19+CD20+IgD+CD27-) com expressão de PD-L1 em CMSP de pacientes ICV com complicação gastrointestinal (ICV-GI) e sem complicações (ICV-SC) em comparação com indivíduos CTRL.....	79
Figura 24: Porcentagem de Linfócito B Naïve (CD19+CD20+IgD+CD27-) com expressão de PD-L1 em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV com complicação gastrointestinal em comparação a indivíduos CTRL.....	80
Figura 25: Porcentagem de linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD+CD27+) em CMSP de pacientes ICV com complicação gastrointestinal (ICV-GI) e sem complicações (ICV-SC) em comparação com indivíduos CTRL.....	81
Figura 26: Porcentagem de linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD+CD27+) em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV com complicação gastrointestinal em comparação a indivíduos CTRL.	82

Figura 27: Frequência de Linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD+CD27+) com expressão de PD-1 em CMSP de pacientes ICV com complicação gastrointestinal (ICV-GI) e sem complicações (ICV-SC) em comparação com indivíduos CTRL.....	83
Figura 28: Frequência Linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD+CD27+) com expressão de PD-1 em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV com complicação gastrointestinal em comparação a indivíduos CTRL.....	84
Figura 29: Frequência de Linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD+CD27+) com expressão de PD-L1 em CMSP de pacientes ICV com complicação gastrointestinal (ICV-GI) e sem complicações (ICV-SC) em comparação com indivíduos CTRL.....	85
Figura 30: Frequência de Linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD+CD27+) com expressão de PD-L1 em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV com complicação gastrointestinal em comparação a indivíduos CTRL.....	86
Figura 31: Frequência de linfócitos B de memória com troca de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD-CD27+CD38+) em CMSP de pacientes ICV com complicação gastrointestinal (ICV-GI) e sem complicações (ICV-SC) em comparação com indivíduos CTRL.....	87
Figura 32: Frequência dos linfócitos B de memória com troca de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD-CD27+CD38+) em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV com complicação gastrointestinal em comparação a indivíduos CTRL.....	88
Figura 33: Frequência de Linfócitos B de memória com troca de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD-CD27+CD38+) com expressão de PD-1 em	89

CMSP de pacientes ICV com complicação gastrointestinal (ICV-GI) e sem complicações (ICV-SC) em comparação com indivíduos CTRL.....

Figura 34: Frequência de Linfócitos B de memória com troca de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD-CD27+CD38+) com expressão de PD-1 em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV com complicação gastrointestinal em comparação a indivíduos CTRL..... 90

Figura 35: Frequência de linfócitos B de memória com troca de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD+CD27+) com expressão de PD-L1 em CMSP de pacientes ICV com complicação gastrointestinal (ICV-GI) e sem complicações (ICV-SC) em comparação com indivíduos CTRL..... 91

Figura 36: Frequência de linfócitos B de memória com troca de classe de imunoglobulina (CD19+CD20+IgD+CD27+) com expressão de PD-L1 em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV com complicação gastrointestinal em comparação a indivíduos CTRL..... 92

Figura 37: Frequência de Plasmoblastos (CD19+IgD-CD27+CD20-CD38+) em CMSP de pacientes ICV com complicação gastrointestinal (ICV-GI) e sem complicações (ICV-SC) em comparação com indivíduos CTRL..... 93

Figura 38: Frequência de Plasmoblastos (CD19+IgD-CD27+CD20-CD38+) em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV com complicação gastrointestinal em comparação a indivíduos CTRL..... 94

Figura 39: Frequência de Plasmoblastos (CD19+IgD-CD27+CD20-CD38+) com expressão de PD-1 em CMSP de pacientes ICV com complicação gastrointestinal (ICV-GI) e sem complicações (ICV-SC) em comparação com indivíduos CTRL..... 95

Figura 40: Frequência de plasmoblastos (CD19+IgD-CD27+CD20-CD38+) com expressão de PD-L1 em CMSP de pacientes ICV com complicação gastrointestinal 96

(ICV-GI) e sem complicações (ICV-SC) em comparação com indivíduos CTRL.....

Figura 41: Porcentagem de expressão de PD-1 nas subpopulações de LB: LB transicional, LB naïve, LB de memória sem troca de classe, LB de memória com troca de classe, e plasmoblastos em CMSP do grupo CTRL..... 97

Figura 42: Porcentagem de expressão de PD-1 nas subpopulações de LB: LB transicional, LB naïve, LB de memória sem troca de classe, LB de memória com troca de classe, e plasmoblastos em CMSP dos pacientes ICV – GI..... 98

Figura 43: Porcentagem de PD-1 nas subpopulações de LB: LB transicional, LB naïve, LB de memória sem troca de classe, LB de memória com troca de classe, e plasmoblastos em CMSP dos pacientes ICV – S/C..... 99

Figura 44: Porcentagem de PD-1 nas subpopulações de LB: LB transicional, LB naïve, LB de memória sem troca de classe, LB de memória com troca de classe, e plasmoblastos em CMSP dos grupos ICV-GI, CTRL e ICV-S/C..... 100

Figura 45: Porcentagem de LTFH (CD4+CXCR5+PD-1+) em CMSP de pacientes ICV com complicação gastrointestinal (ICV-GI) e sem complicações (ICV-SC) em comparação com indivíduos CTRL..... 101

Figura 46: Porcentagem de LTFH (CD4+CXCR5+PD-1+) em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV com complicação gastrointestinal em comparação a indivíduos CTRL..... 102

Figura 47: Correlação da expressão de PD-L1 nos LB e frequência de LTFH. A. Indivíduos do grupo controle; B. Pacientes com ICV do grupo GI; C. Pacientes com ICV do grupo S/C..... 103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Critérios de diagnóstico para ICV (ESID, 2014)	27
Tabela 2: Defeitos Monogênicos associados a ICV e suas principais características.....	29
Tabela 3: Distúrbios do trato gastrointestinal não infecciosos e não malignos associados à ICV.....	34
Tabela 4: Informações sobre o comprimento de onda de excitação e de emissão dos fluorocromos conjugados aos anticorpos utilizados.....	52
Tabela 5: Informações sobre os anticorpos monoclonais utilizados para imunofenotipagem de superfície das subpopulações de LB e co-expressão das moléculas PD-1 e seu ligante PD-L1.....	53
Tabela 6: Informações sobre os anticorpos monoclonais utilizados para imunofenotipagem de superfície do LT _{FH} e a co-expressão das moléculas PD-1 e PD-L1.....	56
Tabela 7: Anticorpo monoclonal característico de viabilidade celular para exclusão de células mortas.....	57
Tabela 8: Características demográficas dos grupos: pacientes ICV com complicações não infecciosas gastrointestinais (ICV-GI), ICV sem complicações (ICV-S/C) e grupo Controle (CTRL).....	62
Tabela 9: Características da Imunodeficiência Comum Variável dos pacientes com alterações gastrointestinais (ICV-GI) e ICV sem complicações (ICV-S/C) participantes deste estudo.....	62

Tabela 10: Manifestações infecciosas e não infecciosas apresentadas pelos 63
pacientes ICV com complicações gastrointestinais (ICV-GI) e ICV sem
complicações (ICV-S/C) participantes deste estudo.....

Tabela 11: Resumos dos resultados deste trabalho comparado com o que está 110
descrito na literatura.....

Zilinski, FR. Avaliação da expressão e função de PD-1 e seu ligante PD-L1 nas subpopulações de linfócitos B em pacientes com Imunodeficiência Comum Variável (ICV) com manifestações Gastrointestinais. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2021

RESUMO

Introdução: A Imunodeficiência Comum Variável (ICV) é uma imunodeficiência primária caracterizada por hipogamaglobulinemia, infecções de repetição, predisposição a doenças autoimunes, inflamatórias e câncer, deficiência de produção de anticorpos específicos decorrentes de distúrbios na diferenciação das linfócitos B (LB) em plasmócitos e células B de memória. As manifestações gastrointestinais estão presentes em 20 a 60% dos pacientes com ICV. Estudos recentes mostram que a via PD-1/PD-L1 pode ter importância na resposta humoral, principalmente durante a sinalização entre linfócitos TFH e linfócitos B, sendo que, quando alterada, pode levar a diminuição das células plasmáticas de vida longa e produção de anticorpos. Hipotetizamos que a expressão da molécula PD-1 e de seu ligante PD-L1 nas diferentes subpopulações de linfócitos B de pacientes com ICV com doença gastrointestinal (ICV-GI) estaria alterada, interferindo na maturação dos plasmoblastos (PBL), que estão diminuídos nestes pacientes. **Objetivos:** avaliar a expressão destas moléculas nas subpopulações de LB dos pacientes com ICV-GI, buscando correlacionar com as diferentes manifestações clínicas e imunológicas relacionadas à doença. **Coorte e Métodos:** Foram coletadas amostras de sangue periférico de 43 pacientes portadores de ICV, sendo 29 com ICV-GI e 14 com apenas infecções de repetição, além de 24 controles saudáveis. Avaliamos a expressão das moléculas PD-1 e PD-L1 nas diferentes subpopulações de LB por citometria de fluxo. **Resultados:** Pacientes com ICV-GI apresentaram frequência reduzida de linfócitos B, aumento de LB transitórios e de LB naïve, redução de LB de memória sem troca de isotipo, LB de memória com troca de isotipo e também de plasmócitos quando comparados aos controles. Comparado ao grupo de pacientes com ICV sem complicações, apenas a frequência de LB transitórios foi significativamente maior. A expressão de PD-1 em LB totais e LB transitórios de pacientes com ICV-GI está reduzida, não se observando diferença nos outros subtipos de LB quando comparados aos controles. Não houve diferença na expressão de PD-1 entre os 2 grupos de pacientes com ICV. **Conclusões:** A expressão de PD-1 e PD-L1 em pacientes com

ICV não se mostrou expressivamente diferente da observada em controles sugerindo que esta via não parece causar um bloqueio na maturação dos LB, entretanto, mais estudos são necessários para entender como essa via se comporta nos LB desses pacientes

Descritores: 1. Imunodeficiência Comum Variável; 2. Subpopulações de Linfócitos B; 3. PD-1 e PD-L1; 4. Gastroenteropatias; 5. Citometria de Fluxo.

Zilinski, FR. *Evaluation of the expression and function of PD-1 and its ligand PD-L1 in subpopulations of B lymphocytes in patients with Common Variable Immunodeficiency (CVID) with gastrointestinal manifestations.* [Dissertation]. “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”, 2021

ABSTRACT

Introduction: Common Variable Immunodeficiency (CVID) is a primary immunodeficiency characterized by hypogammaglobulinemia, recurrent infections, predisposition to autoimmune and inflammatory diseases and cancer, deficiency in the production of specific antibodies resulting from disturbances in the differentiation of B lymphocytes (LB) into plasma cells and memory B cells. Gastrointestinal manifestations are present in 20 to 60% of patients with CVID. Recent studies show that the PD-1 / PD-L1 pathway may be important in the humoral response, especially during signaling between TFH and B lymphocytes, and when altered, it can lead to a decrease in long-lived plasma cells and production of antibodies. We hypothesized that the expression of the PD-1 molecule and its ligand PD-L1 in the different subpopulations of B lymphocytes of patients with CVID with gastrointestinal disease (CVID-GI) would be altered, interfering in the maturation of plasmoblasts (PBL), which are decreased in these patients. **Objectives:** to evaluate the expression of these molecules in LB subpopulations of patients with CVID-GI, looking to correlate with the different clinical and immunological manifestations related to the disease. **Cohort and Methods:** Peripheral blood samples were collected from 43 patients with ICV, 29 with CVID-GI and 14 with only recurrent infections, in addition to 24 healthy controls. We evaluated the expression of the PD-1 and PD-L1 molecules in different LB subpopulations by flow cytometry. **Results:** Patients with CVID-GI showed a reduced frequency of B lymphocytes, an increase in transitional B cells and naïve B cells, a reduction in unswitched memory B cells, switched memory B cells and also in plasmoblasts cells when compared to controls. Compared to the group of patients with infections only CVID, only the frequency of transitional B cells was significantly higher. The expression of PD-1 in total B cells and transitional B cells in patients with CVID-GI is reduced, with no difference being observed in the other B lymphocytes subtypes when compared to HC. There was no difference in the expression of PD-1 between the 2 groups of patients with CVID. **Conclusions:** The expression of PD-1 and PD-L1 in

patients with CVID was not significantly different from that observed in HC, suggesting that this pathway does not seem to cause a block in the maturation of B cells, however, further studies are needed to understand how this pathway behaves in the B cells of these patients.

Keywords: 1. Common Variable Immunodeficiency (CVID); 2. B Lymphocyte Subpopulation; 3. PD-1 and PD-L1; 4. Gastrointestinal diseases; 5. Flow Cytometry.

1. INTRODUÇÃO

O Sistema Imune é o responsável pela defesa do organismo, com função de proteger o indivíduo da invasão de microorganismos ¹. As células B atuam na linha de frente promovendo imunidade diante dos patógenos através das células B de memória e da secreção de anticorpos pelas células plasmáticas². Durante o desenvolvimento e diferenciação das células B ocorrem eventos de recombinação gênica com amplo espectro de especificidade para que o receptor de célula B (BCR) seja capaz de reconhecer qualquer antígeno. Somente as células B que expressam a porção não-autorreativa do BCR são toleradas e capazes de sobreviver³. A partir de então, os linfócitos B (LB) saem da medula óssea expressando dois isotipos de imunoglobulinas (Ig) chamadas de IgM e IgD. Ambos isotipos são expressos por meio de *splicing* alternativo e possuem especificidade idêntica. Ao haver o encontro com antígeno através do seu BCR, esses LB naïve que estavam em repouso, tornam-se ativados e subsequentemente passam a gerar uma resposta imune. A expansão clonal é fundamental para que a resposta das células B do centro germinativo (GC) seja funcional e produza uma quantidade ideal de células selecionadas capazes de garantir a memória imunológica. As vias e moléculas que controlam as respostas proliferativas são essenciais para modular a resposta imune que adquirimos por meio de contato com antígenos¹

O defeito de um ou mais componentes do Sistema Imune podem induzir a patologias graves, que são coletivamente designadas como Imunodeficiências Primárias⁴ ou, mais recentemente, Erros Inatos da Imunidade (EII). Falhas do Sistema Imune podem envolver elementos da Imunidade Inata como fagócitos mononucleares, polimorfonucleares, células dendríticas, células Natural Killer (NK) e proteínas do Sistema Complemento, ou da imunidade adaptativa, como os linfócitos T (LT) e B, levando mais frequentemente a quadros de infecções de repetição, mas também, doenças autoimunes, alergias, alterações endócrinas e desenvolvimentos de tumores ⁵.

1.1. Imunodeficiência comum variável (ICV)

As imunodeficiências primárias (IDPs), mais recentemente denominadas de erros inatos da imunidade (EII) são doenças raras causadas por defeitos hereditários do sistema imune, sendo descritos até o momento mais de 416 doenças⁶

A imunodeficiência comum variável é mais provavelmente um grupo de IDPs que tem em comum a hipogamaglobulinemia. Está classificada no grupo de deficiências predominante

de anticorpos, sendo diagnosticada por exclusão de outras causas primárias e secundárias de deficiências de anticorpos. Caracteriza-se por defeitos na diferenciação das células B em plasmócitos e células B de memória, levando a hipogamaglobulinemia. Não há dados precisos em relação à prevalência das ICVs, entretanto, é estimada que ocorra entre 1 em cada 50.000 pessoas até 1 a cada 10.000, sendo a IDP sintomática mais comum em adultos ^{7; 8}.

O início das manifestações clínicas da ICV ocorre de forma bimodal, podendo surgir na infância antes dos 10 anos, com pico de diagnóstico entre 5 e 10 anos e um outro pico entre 30 e 40 anos, entretanto, pode se manifestar em qualquer idade. Aparentemente homens e mulheres são afetados igualmente, entretanto, estudos mostram que existe uma predominância do sexo masculino (2:1) antes dos 11 anos, e esta diferença vai se tornando cada vez menos pronunciada até os 30 anos, e, após a terceira década de vida há um ligeiro predomínio do sexo feminino (1,3:1) ^{9; 10}.

A ICV é uma doença complexa e heterogênea, que apresenta uma variada gama de manifestações clínicas e imunológicas. Os pacientes apresentam infecções recorrentes e frequentemente graves, são mais susceptíveis a doenças autoimunes e inflamatórias, assim como doenças malignas. Além das infecções, especialmente do trato respiratório e gastrointestinal, os pacientes podem apresentar doença inflamatória intestinal, doença pulmonar intersticial, doença granulomatosa, hiperplasia linfóide e neoplasias do sistema linforreticular ou tumores sólidos ^{7; 9; 10}.

Na figura 1 podemos observar as principais manifestações que acometem os pacientes do complexo Hospital das Clínicas – FMUSP.

Figura 1: Manifestações clínicas da ICV nos pacientes acompanhados no complexo HC-FMUSP, 2019 (n=180). As infecções recorrentes estão presentes em 98% dos pacientes. AHA: anemia hemolítica autoimune; PTI: purpura trombocitopênica imunológica; AR: artrite reumatoide.

Fonte: Ambulatório de Imunologia Clínica e Alergia- HCFMUSP, 2019 dados não publicados

Em 1999, a Sociedade Europeia de Imunodeficiências (ESID) e o Grupo Panamericano de Imunodeficiências (PAGID) definiram os critérios diagnósticos da ICV: 1. diminuição dos níveis séricos de IgG (menor que 2 desvios padrão abaixo da média para a idade), devendo ser acompanhada pela diminuição dos níveis séricos de IgA e/ou IgM; 2. início da imunodeficiência a partir do segundo ano de vida; 3. ausência de isohemaglutininas e/ou resposta a vacinas; e 4. exclusão de outras causas de hipogamaglobulinemia ¹¹.

Posteriormente, devido ao amplo número de diagnósticos diferenciais de hipogamaglobulinemia, e pela possibilidade de haver retardo na maturação do sistema imune caracterizando a hipogamaglobulinemia transitória da infância, foi recomendado que o diagnóstico de ICV seja estabelecido após os 4 anos de idade (3). Em 2014, a ESID atualizou os critérios diagnósticos para ICV, sendo definido que o paciente deve apresentar os seguintes critérios maiores: redução dos níveis séricos de IgG, exclusão de outras causas de hipogamaglobulinemia e definição do diagnóstico após os 4 anos de vida. Além disso, o paciente deveria apresentar uma ou mais sequelas clínicas relacionadas à falha do sistema imune; três ou mais evidências laboratoriais que corroborem (como deficiência de IgA, podendo ser acompanhado também da redução de IgM, além da ausência de isohemaglutininas e/ou resposta a vacinas, níveis reduzidos de células B de memória), e a

presença qualquer um dos marcadores histológicos relativamente específicos de ICV. Os critérios diagnósticos estão descritos na tabela 1 ¹².

Tabela 1. Critérios diagnósticos para ICV (ESID, 2014)

Imunodeficiência Comum Variável (ICV)		
Critérios para provável diagnóstico clínico	Sugestão	para diagnóstico alternativo
<ul style="list-style-type: none"> • Ao menos um dos seguintes: <ul style="list-style-type: none"> - Susceptibilidade aumentada a infecções - Manifestações autoimunes - Doença granulomatosa - Linfoproliferação policlonal inexplicável - Ter algum membro na família com deficiência de anticorpos • <u>E</u> diminuição dos níveis séricos de IgG e IgA, podendo ou não ser acompanhada da diminuição de IgM (<2 desvios padrão da média para a idade). • <u>E</u> ao menos um dos seguintes: <ul style="list-style-type: none"> - Não responder bem a vacinas e/ou ausência de isohemaglutininas - Redução das células B de memória (<70 % da média para a idade). • <u>E</u> exclusão de outras causas de hipogamaglobulinemia • <u>E</u> diagnóstico pode ser estabelecido após os 4 anos de idade, entretanto os sintomas podem aparecer antes • <u>E</u> nenhuma evidência de deficiência profunda de células T, definidas como as seguintes: <ul style="list-style-type: none"> - CD4 (cél/s/μL): 2 a 6 anos <300, 6 a 12 anos <250, >12 anos <200 - %CD4 naïve: 2 a 6 anos <25%, 6 a 16 anos <20%, >16 anos <10% - Ausência de proliferação de células T. 	<ul style="list-style-type: none"> • Pacientes menores de 4 anos devem ser considerados como “deficiência de anticorpos não-classificada” • Pacientes com evidência de deficiência profunda de células T devem ser considerados como “imunodeficiência combinada não-classificada”. 	

Adaptado de: The European Society for Immunodeficiencies (ESID) registry 2014

Como o próprio nome indica, os pacientes com ICV apresentam uma variedade de manifestações clínicas que tornam o diagnóstico difícil de ser realizado, a União Internacional das Sociedades de Imunologia (IUIS) que se reúne periodicamente para rever a classificação de imunodeficiências primárias define a ICV como um grupo de distúrbios com fenótipos clínicos e laboratoriais ao invés de um único distúrbio ¹³. Com base nessa dificuldade, ao longo dos anos, estudiosos tentam encontrar alternativas melhores para subdividir este grupo de doenças. Analisar o exoma completo e o genoma inteiro dos pacientes com ICV para a descoberta de defeitos genéticos associados à doença é uma das opções que pode facilitar o diagnóstico, entretanto, pelo menos 50% dos pacientes não tem um diagnóstico molecular definido. Apenas 30 a 54% das coortes de ICV apresentam algum defeito molecular associado, porém, em sua maioria ocorrem de forma esporádica, enquanto que 10 a 20% dos indivíduos tem histórico familiar positivo ^{14; 15; 16}.

Causas epigenéticas e fatores ambientais são cada vez mais descritos em associação a diversas doenças, e na ICV não é diferente, muitos dos genes identificados com fenótipo de ICV podem estar presentes em outras síndromes ou distúrbios, podendo inclusive em alguns casos estar presentes na população saudável, como por exemplo, mutações no gene *TACI* (*Transmembrane Activator and CAML Interactor*) que estão presentes em 10% dos pacientes com ICV e em 1% dos indivíduos saudáveis ^{7; 17; 18; 19; 20}.

Na ICV, mutações autossômicas recessivas como *ICOS*, *CD19*, *CD20*, *CD21*, *CD27*, *CD81*, *IL-21*, *IL-21-R*, *LRBA*, *PRKCD*, *RAC2*, geralmente associadas à consanguinidade foram os primeiros defeitos monogênicos descritos. Desde então defeitos autossômicos dominantes como *TNFSF12*, *CTLA-4*, *PLCG2*, *NFKB1*, *NFKB2*, *PIK3CD*, *PIK3R1*, *VAV1*, *BLK*, *IKZF-1* e *IRF2BP2* e mutações bialélicas em genes como *TACI* e *BAFF-R* (*B cell activating fator receptor*), *ADA* (adenosina deaminase), *RAG1* e *RAG 2* (*Recombination activating gene 1 and 2*) também foram descritas como causadoras do quadro de ICV ^{7; 15; 16; 21; 22}. Na tabela 2 podemos observar os principais defeitos genéticos já descritos bem como suas características ^{7; 23}.

Tabela 2. Defeitos monogênicos associados a ICV e suas principais características

Gene	Características clínicas	Características laboratoriais
<i>CD19</i>	Infecções respiratórias recorrentes	Nível baixo de IgG e IgA, não responde bem a vacinas, LB normais e poucos LB de memória
<i>CD20</i>	Infecções respiratórias recorrentes	Nível baixo de IgG, não responde bem a vacinas, LB normais e poucos LB de memória com troca de isotipo
<i>CD21</i>	Infecções respiratórias recorrentes e diarreia	Nível baixo de IgG, responde bem a vacinas, LB normais e poucos LB de memória com troca de isotipo
<i>CD27</i>	EBV associados a distúrbios linfoproliferativos, linfoma e alguns casos sinusite recorrente	Nível baixo de IgG e IgA, não responde bem a vacinas, disfunção de células T, LB normais e ausência de LB de memória
<i>CD81</i>	Infecções respiratórias recorrentes, Púrpura de Henoch-Schönlein, PTI	Nível baixo de IgG e IgA, não responde bem a vacinas, LB normais e poucos LB de memória
<i>CTLA-4</i>	Autossômica dominante, infecções respiratórias, diarreia, infiltrado em órgãos linfoides, autoimunidade	Nível baixo de IgG e IgA, não responde bem a vacinas, LB totais diminuídos e poucos LB de com troca de isotipo
<i>ICOS</i>	Infecções respiratórias recorrentes, infecções gastrointestinais, autoimunidade em alguns	Nível baixo de IgG e IgA (IgM em alguns casos), não responde bem a vacinas, poucos LB totais, poucos LB de memória e baixa função efetora de LT CD4/CD8
<i>IL21</i>	Infecções respiratórias recorrentes, <i>Cryptosporidium</i> , outras infecções bacterianas/ virais	Nível baixo de IgG, nível alto de IgE, não responde bem a vacinas, poucos LB, poucos LB de memória, pouca produção de citocinas por LT, baixa citotoxicidade de células NK
<i>IL21R</i>	Infecções respiratórias recorrentes, IBD	Nível baixo de IgG, nível alto de IgE, não responde bem a vacinas, poucos LB, poucos LB de memória, baixa resposta de

		LT a antígenos
<i>LRBA</i>	Infecções respiratórias recorrentes, enteropatia, citopenias autoimunes	Nível baixo de IgG, IgA e IgM, não responde bem a vacinas, poucos ou normais LB totais, poucos LB de memória com troca de isotipo
<i>NFKB2</i>	Autossômica dominante, infecções respiratórias recorrentes, meningite meningocócica, insuficiência adrenal, PTI	Em alguns casos: nível baixo de IgG, IgA e/ou IgM, não responde bem a vacinas, LB normais e poucos LB de memória
<i>PIK3CD</i>	Autossômica dominante ou recessiva, infecções respiratórias recorrentes, autoimunidade, linfoma de células B	Nível baixo de IgG e IgA, IgM aumentada, não respondem bem a vacinas, poucos LT e LB, poucos LB de memória com troca de isotipo, muitos LB transicionais
<i>PIK3R1</i>	Autossômica dominante ou recessiva, infecções respiratórias recorrentes, Linfoma de células B, atraso no desenvolvimento neurológico	Nível baixo de IgG e IgA, IgM aumentada
<i>RAC-2</i>	respiratórias recorrentes, glomerulonefrite pós-estreptocócica, tireoidite autoimune	Nível baixo de IgG, IgA e IgM, não responde bem a vacinas, poucos/ normais LB, poucos LT virgem
<i>TWEAK</i>	Autossômica dominante, infecções respiratórias recorrentes, meningite meningocócica, verrugas	Nível baixo de IgG e IgA, não produz anticorpo anti-pneumocócico não responde bem a vacinas, poucos/normais LB totais e poucos LB de memória, neutropenia, trombocitopenia
<i>BAFF-R</i>	Autossômica recessiva, presente em diversas manifestações clínicas	Nível baixo de IgG e IgM
<i>NFKB1</i>	Autossômica dominante, infecções sinopulmonares recorrentes, DPOC, EBV associado a distúrbios linfoproliferativos, citopenias	Nível normal ou baixo de IgG, IgA e IgM, normal ou pouco LB, pouco LB de memória

	autoimunes, alopecia, e tireoidite autoimune	
<i>NFKB2</i>	Autossômica dominante, infecções sinopulmonares recorrentes, alopecia, endocrinopatias	Nível baixo de IgG, IgA e IgM, pouco LB
<i>IKZF1</i>	Autossômica dominante, infecções recorrentes, LLA	Nível baixo de IgG e IgA e/ou IgM
<i>LRBA</i>	Autossômica recessiva, DPI, autoimunidade, doença inflamatória intestinal, endocrinopatias em alguns pacientes	Nível baixo de IgG e IgA
<i>IRF2BP2</i>	Autossômica dominante, infecções recorrentes, Colite	Hipogamaglobulinemia
<i>MOGS</i>	Autossômica recessiva, infecções virais e bacterianas, distúrbios neurológicos severos, hipotonia, convulsões, características dismórficas	Hipogamaglobulinemia
<i>PTEN</i>	Autossômica dominante, infecções recorrentes, síndrome de Cowden, macrocefalia	Nível baixo de IgG e IgA
<i>TRNT1</i>	Autossômica recessiva, anemia sideroblástica congênita, surdez, atraso no desenvolvimento	Linfopenia de LB, Nível baixo de IgG, IgA e IgM
<i>TTC37</i>	Autossômica recessiva, infecções recorrentes virais e bacterianas, tricrorexia nodosa	Hipogamaglobulinemia por produção deficiente de anticorpo
<i>ATP6AP1</i>	Autossômica dominante, Hepatopatia, anormalidades neurocognitivas	Hipogamaglobulinemia
<i>PLCG2</i>	Autossômica dominante, urticária a	Nível baixo de IgG e IgA, poucos LB,

frio, lesões cutâneas, pneumonite
intersticial inespecífica

produção deficiente de anticorpos

Adaptado de Bonilla *et al.*, 2016; Picard C, Gaspar HB, AL-Herz W, et al.2018. [Abreviações: EBV= Vírus Epstein Barr; IBD = Doença inflamatória intestinal; PTI = purpura trombocitopenica idiopática; NK = células assassinas naturais]; DPOC = Doença pulmonar obstrutiva crônica; LLA = Leucemia linfoblástica aguda; DPI = Doença pulmonar intersticial ³⁷.

Uma alternativa que se tem adotado para tentar caracterizar a ICV de forma mais homogênea é dividir os pacientes de acordo com fenótipo clínico. Chapel *et al.*, 2008 ²⁴ propuseram a divisão dos pacientes em cinco fenótipos: a) sem complicações (apenas infecções de repetição); b) presença de autoimunidade; c) doença linfoproliferativa benigna; d) enteropatia; e) presença de linfoma. Jolles *et al.*, 2012 ²⁵ propôs os seguintes subgrupos: a) sem complicações (apenas infecções de repetição), b) citopenias (trombocitopenias, anemia hemolítica e neutropenias), c) pacientes com linfoproliferação policlonal (granulomas, pneumonia linfocítica intersticial, linfadenopatia persistente inexplicável) e d) enteropatias não-explicadas. Mais recentemente, em 2015, Abbott *et al.* dividiram os pacientes clinicamente em: portadores de doenças hepáticas, doenças intestinais, doenças pulmonares, citopenias, doenças linfoproliferativas e malignidade⁸.

Por último, Bonilla *et al.* (2016) sugerem a divisão em 2 grupos: os com infecções apenas e os que apresentam complicações não-infecciosas; uma vez que o primeiro grupo tem comportamento semelhante a indivíduos normais e o segundo tem risco de morte 11 vezes maior⁷.

1.2. Manifestações gastrointestinais na ICV

O intestino é o maior órgão linfoide no organismo, contendo a maioria dos linfócitos e produzindo grandes quantidades de imunoglobulinas. Ele é constantemente exposto a microorganismos como vírus, bactérias e parasitas, sendo que o sistema imune da mucosa é regulado para controlar esta exposição, estando próximos de um grande reservatório de linfócitos, macrófagos e células dendríticas. À exposição, o sistema imune pode tanto suprimir como tolerar os antígenos, contrastando com o que se observa na resposta imune sistêmica. A disfunção da regulação deste balanço pode causar inflamação e danos da mucosa, causando doenças gastrointestinais, justificando a presença frequente destas manifestações em pacientes com deficiências imunológicas²⁶.

A manifestação clínica mais comum nas IDPs em geral são as infecções respiratórias, contudo, com os avanços nas ferramentas de diagnóstico, com antibioticoterapia e com a reposição de imunoglobulina essas infecções passam a ser mais bem controladas. Por outro lado, as infecções que afetam o TGI são mais difíceis de serem contidas. Como já salientado, as manifestações intestinais são muito comuns nos pacientes com ICV, podendo inclusive ser a primeira apresentação a ocorrer nestes indivíduos. Ainda, comparado a outras IDPs como agamaglobulinemia ligada ao cromossomo X e deficiência seletiva de IgA as manifestações gastrointestinais são mais prevalentes nos pacientes com ICV, sugerindo que, além da deficiência de anticorpo a piora na cooperação entre células B e T é essencial para ocorrência dessas manifestações^{27; 28; 29}.

As manifestações do TGI podem ser classificadas em 4 grupos: 1. Infecção; 2. Inflamação; 3. D. Autoimunes; 4. Malignidade. Essas manifestações estão presentes em 20 a 60% dos pacientes com ICV, sendo a diarreia infecciosa aguda ou crônica descrita como o sintoma mais comum. Ainda, estudos recentes sugerem que infecções do Trato Gastrointestinal (TGI) são mais frequentes em pacientes que apresentam IgA indetectável. Diversos tipos de infecções do TGI têm sido descritos na ICV, incluindo *Giardia*, *Campylobacter*, algumas espécies de *Salmonella*, e Citomegalovírus (CMV), ainda, recentemente Norovírus foi observado como uma infecção entérica cada vez mais importante nestes pacientes, levando a uma enteropatia crônica em alguns casos^{28; 30; 31; 32}.

Dentre as doenças gastrointestinais não infecciosas, a enteropatia está presente em 10 a 12% dos pacientes e pode se assemelhar a outras doenças do TGI como doença de Crohn, colite ulcerativa ou doença celíaca. Ainda, os pacientes com ICV podem apresentar outras doenças gastrointestinais, incluindo hiperplasia nodular linfoide (HNL), gastrite atrófica, doença inflamatória intestinal, colite linfocítica e indícios de doença celíaca no duodeno. Essas condições parecem compartilhar de uma resposta imune anormal no TGI, apoiada pelo fato de muitos desses pacientes apresentarem também manifestações autoimunes. Entretanto, a frequência dessas manifestações na ICV, assim como a relação da ICV com sintomas GI e outras características imunológicas ainda não estão bem definidas. É possível observar os distúrbios do TGI não infecciosos e não malignos associados à ICV na tabela 3^{30; 31; 32}.

Tabela 3. Distúrbios do trato gastrointestinal não infecciosos e não malignos associados à ICV

Órgão	Manifestação	Manifestação clínica	Potenciais características histológicas	Diagnóstico diferencial
Estômago	Gastrite crônica	Dor abdominal, vômito, náusea.	<ul style="list-style-type: none"> - Infiltração linfocitária - Atrofia do antro e do corpo do estômago - Displasia do antro e do corpo do estômago - Metaplasia do antro e do corpo do estômago - Ausência de células plasmáticas 	<ul style="list-style-type: none"> - Anemia perniciosa (gastrite autoimune) - <i>Helicobacter pylori</i> associado a gastrites
	Atrofia das vilosidades	Desnutrição Diarreia crônica	<ul style="list-style-type: none"> - Aplasia das vilosidades - Linfocitose intraepitelial - Hiperplasia folicular linfoide - Duodenite linfocítica - Infiltrado 	Doença celíaca refratária

Intestino delgado			neutrofílico - Lesões da doença do enxerto contra hospedeiro (Lesões GHV) - Ausência de células plasmáticas	
	Crescimento anormal de bactérias	- Diarreia crônica - Desconforto abdominal - Desnutrição	Não específico	- Obstrução mecânica - Histórico de cirurgia abdominal
	Enteropatia exsudativa crônica	- Diarreia crônica - Desnutrição - Anasarca	- Linfangiectasia - Enterites	- Doença de Whipple - Linfoma intestinal - Trombose venosa de Porto-mesentérica
	Enterites crônicas	- Dor abdominal - Diarreia	- Úlceras - Infiltrado neutrofílico - Lesões GHV - Infiltrado linfocítico - Hiperplasia folicular linfoide - Granuloma - Ausência de células	- Doença celíaca - Doença de Crohn

			plasmáticas	
Cólon	Colites crônicas	<ul style="list-style-type: none"> - Diarreia - Dor abdominal - Sangue nas fezes 	<ul style="list-style-type: none"> - Úlceras - Abscessos da cripta - Criptites - Infiltrado neutrofílico - Lesões GHV - Infiltrado linfocítico - Hiperplasia folicular linfoide - Granuloma - Ausência de células plasmáticas 	<ul style="list-style-type: none"> - Doença de Crohn - Colites ulcerativas - Colites microscópicas

Adaptado de: Uzzan et al 2016

1.3. LB e a Imunodeficiência comum variável

As células-tronco hematopoiéticas dão origem a todas as linhagens de células sanguíneas, podendo amadurecer e gerar progenitores linfoides, que dão origem as células B, células T, células linfoides inatas e algumas células dendríticas. As células tronco presentes na MO originam as células B foliculares e de zona marginal (MZB), enquanto as células derivadas do fígado fetal originam as células B-1. Existem duas vias principais de ativação e diferenciação de células B foliculares em células secretoras de anticorpos: (1) Via do centro germinativo (GC) onde é produzido as células de memória de vida longa e os plasmócitos; e (2) a via extra folicular onde são produzidos os Blastos de células B e os plasmoblastos, porém, através de uma resposta independente de célula T a via extracelular também pode produzir células B de memória de vida longa e plasmócitos^{33; 34}.

Todas as populações de células B encontradas nos tecidos linfoides, com exceção das células do GC, podem ser demonstradas em sangue periférico através de marcadores de

superfície como CD19, CD20, IgD, CD27, CD38 e CD24³⁴. Na figura 2 podemos observar as etapas da Ontogenia dos LB.

Figura 2: Desenvolvimento e diferenciação de células B. Os linfócitos B desenvolvem-se a partir de uma célula tronco hematopoiética e passam por diversos estágios de diferenciação tanto na Medula Óssea, como periferia e centro germinativo. As setas (→) indicam associações claras e bem descritas na literatura da ontogenia dos LB, enquanto as setas (- - ->) representam associações que são teórica, porém são bem apoiadas pela literatura.

Adaptado de: Sanz et al., 2019.

O defeito mais comum encontrado na ICV é a falha na diferenciação de LB em células de memória e células secretoras de anticorpos. O número total de células B do sangue periférico pode estar levemente reduzido em 40 a 50% dos pacientes¹⁶ entretanto, nos pacientes com infiltrado policlonal e autoimunidade os LB totais podem estar aumentados.

Apenas 10% dos pacientes apresentam redução drástica ou ausência de células B, sendo que a progressão da doença tende a ser mais rápida e grave nestes pacientes ^{16; 35}.

Em 2008, Wehr et al., realizaram um estudo com 303 pacientes com ICV a fim de estabelecer um consenso entre as duas classificações existentes baseadas na fenotipagem de células B através da citometria de fluxo (classificação de Freiburg e Paris), propondo a classificação EUROclass, sendo as células B caracterizadas pela expressão de CD19, IgD/IgM, CD27, CD21 e CD38, onde os pacientes com mais de 1% de células B circulantes (B⁺, cerca de 90% dos pacientes) foram diferenciados daqueles com menos de 1% de células B circulantes (B⁻, menos de 10% dos pacientes) ^{16; 36}.

O ensaio da EUROclass confirmou as associações clínicas de esplenomegalia e doença granulomatosa com a redução de células B de memória e expansão de células B CD21^{low} e ainda revelou pela primeira vez a expansão de células B transitórias em pacientes com linfadenopatia ^{16; 36}. Na nossa coorte, Pedreschi *et al.*, 2014 ³⁷ também observou redução das células de memória comutadas, entretanto, não observou alteração de frequência das MZBs. Em um estudo anterior realizado em 2011 Pedreschi *et al.*, observou redução do número de plasmoblastos, mas sem correlação com a presença de autoimunidade e, em relação as células CD21^{low}, constatou um aumento desta população nos pacientes com ICV, mas apenas no sexo feminino.

1.4. Linfócito T folicular (LT_{FH}) e via PD-1/PD-L1

Para geração de anticorpos é essencial que ocorra uma interação precisa no GC entre as células Tfh e LB, logo, qualquer falha neste eixo pode levar à defeitos de anticorpos e hipogamaglobulinemia. Durante o processo de ativação dessas células é necessário, além da apresentação de antígenos, o segundo sinal de ativação através dos co-receptores. Há evidências que as células T CD4⁺ que expressam CXCR5 no sangue periférico, são células que antecedem as células Tfh presentes no GC, que por sinal, são células com elevada expressão de proteína de morte celular programada 1 (PD-1), que é um co-receptor com função inibitória cuja função ainda não foi bem esclarecida em células B. Coraglia *et al.* em 2016 estudaram as características e funções das células Tfh em pacientes com ICV. Enquanto alguns estudos indicam que o bloqueio da via PD-1/PD-L1 e PD-L2 geram uma resposta atenuada de anticorpos³⁸, outros, indicam aumento da resposta imune em conjunto com aumento do número de LT_{FH}³⁹. Coraglia et al.(2016) relataram que essas células são mais

expressas nestes pacientes do que em indivíduos saudáveis, tendo observado inclusive o aumento da coexpressão das moléculas CXCR5 e PD-1, em especial no grupo de pacientes com ICV e autoimunidade ⁴⁰.

A família de coestimuladores CD28/B7 é uma das mais importantes para formar e regular a resposta imune adaptativa, sendo composta pelos sinais positivos de CD28 e coestimulador induzível de célula T (ICOS) e pelos sinais negativos de proteína 4 associada a linfócito T citotóxico (CTLA-4), PD-1 e atenuador de linfócito T e B (BTLA). Estes sinais são conhecidos principalmente pelo seu papel regulador na ativação nos linfócitos T, entretanto, também estão envolvidos em outros aspectos do sistema imune adaptativo, como na diferenciação de linfócitos, maturação, adesão, quimiotaxia e produção de citocinas ⁴¹.

Figura 3: Co-receptores. São as moléculas responsáveis por regular a resposta imune, gerando sinais de estímulo positivo, promovendo a ativação dos linfócitos e permitindo sua diferenciação, ou gerando sinais negativos responsáveis por atenuar a resposta imune. As moléculas supressoras são representadas por LAG3, TIM-3, PD-1 e CTLA-4 e seus respectivos ligantes B7-H3 ou H4, Galectina 9, PD-L1 ou PD-L2 e B7-1 ou B7-2. As moléculas estimuladoras são representadas por CD28, ICOS, HVEM, OX40, 41BB, CD40L e seus respectivos ligantes B7-1-B7-2, ICOS-L, LIGHT, OX40L, 41BBL e CD40.

Adaptado de: Iwai et al., 2017

PD-1 é uma proteína de transmembrana do tipo 1 de 288 aminoácidos (aa) constituída por um domínio da superfamília de imunoglobulina, uma haste com 20 aminoácidos, um domínio de transmembrana, e um domínio intracelular com aproximadamente 95 resíduos

contendo um motivo de inibição baseado na tirosina do imunoreceptor (ITIM), assim como um motivo de troca com base na tirosina do imunoreceptor (ITSM). PD-1 é codificado pelo gene *Pdcd1* no cromossomo 1 em camundongos e no cromossomo 2 em humanos. Já o seu ligante PD-L1 é uma proteína de transmembrana do tipo 1 de 290 aa que é codificada pelo gene *Cd274* no cromossomo 19 em camundongos e no cromossomo 9 em humanos, enquanto que o outro ligante de PD-1 o PD-L2 que também é uma proteína de transmembrana do tipo 1 é codificada pelo gene *Pdcd1lg2* adjacente ao *Cd274* e separados por apenas 23kb de DNA genômico em camundongos e 42kb em humanos ^{42; 43}.

PD-1 é uma molécula conhecida por desempenhar dois papéis principais, tendo função benéfica para o sistema imune, regulando negativamente respostas imunes ineficazes ou prejudiciais, por outro lado, também pode agir de forma nociva, causando a dilatação de células neoplásicas ao interferir na resposta imune. Sua expressão é observada principalmente em células T ativadas, estando sua expressão acentuada em situações de infecções virais crônicas, auto antígenos e tumores, estando principalmente associada à exaustão de LT de memória. PD-1 também pode ser encontrado el LB, monócitos, e células mielóides, sugerindo um papel importante na regulação das respostas imunes ^{38; 41; 43}.

PD-L1 e PD-L2 são os ligantes de PD-1 e competem entre si pela ligação. PD-L1 é expresso constitutivamente em linfócitos T, LB, macrófagos e células dendríticas, sendo sua expressão autorregulada após a ativação destas células. Sua expressão também é verificada em células não linfóides, como células endoteliais no coração, células pancreáticas, células gliais no cérebro inflamado, células trofoblásticas, e células musculares. Por outro lado, PD-L2 é expresso em uma gama menor de células, sendo encontrado na maioria das APCs e células T CD4⁺ ativadas, sendo que, em 2007 Zhong *et al.*, demonstraram que este ligante pode ser encontrado também nas células B ^{38; 41; 43; 44}.

Em 2010, Good-Jacobson *et al.* relataram que PD-1 e seus ligantes tinham um papel desconhecido na regulação da resposta humoral primária e que o efeito mais proeminente na ausência PD-1 era a diminuição das células plasmáticas de vida longa. Eles utilizaram camundongos com deficiência de PD-1 ou em PD-L1 e/ou PD-L2 juntamente com a transferência de células da medula óssea para delinear as principais interações e requisitos celulares para a regulação da resposta, e seus resultados mostraram o envolvimento de PD-1 nas células T e de PD-L1 e/ou PD-L2 nas células B para a formação das células plasmáticas de vida longa ³⁸.

A sinalização intrínseca de PD-1 durante a ontogenia dos LB tem papel importante para geração de diferentes subgrupos de células B com diferentes papéis imunológicos como

produção de anticorpo e apresentação de antígenos, também tem função protetora já que impede o sistema imune de atacar à antígenos próprios ⁴⁵. Em 2013, Thibult *et al.*, estudaram a expressão de PD-1 nos linfócitos B, relatando que essa molécula era encontrada em todas as subpopulações. Entretanto, no centro germinativo PD-1 era fracamente expressa, enquanto nas outras subpopulações sua expressão era elevada, sugerindo que no centro germinativo, essa molécula sofreria um “switch off”, ou seja, ela se desliga para não inibir a ativação das células e assim os LB poderiam proliferar e diferenciar em células de memória.

Cubas *et al.*, 2013, notaram que na interação dos LB e células Tfh no centro germinativo em pacientes com HIV, ocorria um aumento da expressão de PD-1, que resultava na inibição da proliferação e ativação celular, além da inibição da atividade de ICOS, afetando outros fatores de transcrição e reduzindo a secreção de citocinas importantes como IL-4 e IL-21. Consequentemente, a diferenciação terminal de LB em células plasmáticas e produção de imunoglobulinas estaria prejudicada. Ainda, descreveram, que a suplementação com IL-21 pode restaurar e melhorar a produção de anticorpos e que o bloqueio da via PD-1/PD-L1 através de um ensaio de cocultura de linfócitos Tfh com células B restaura significativamente a produção de IgG. Contudo, em indivíduos sem infecção não houve melhora na produção de anticorpos.

Figura 4: Efeito da Via PD-1/PD-L1. Essa via funciona regulando a resposta imune negativamente, suprimindo a proliferação, ativação, sobrevivência e expressão de ICOS, consequentemente essa redução dos níveis de ICOS afetam os sinais de transcrição de c-MAf, levando a redução da expressão de IL-21 e Il-4 que são citocinas

importantes para prevenir a apoptose e induzir a sobrevivência de LB e proliferação e diferenciação dessas células em plasmócitos.

Adaptado de: Cubas *et al.*, 2013

Acreditamos que uma alteração na via de sinalização de PD-1/PD-L1 influencie na produção de anticorpo nos pacientes com ICV, levando a hipogamaglobulinemia, sendo de suma importância entender como estas moléculas se desenvolvem nas subpopulações de células B bem como se comportam durante a interação entre os LB e as células Tfh.

2. JUSTIFICATIVA

Pacientes com ICV apresentam níveis reduzidos de linfócitos B comutados e níveis reduzidos ou ausentes de plasmoblastos por conta de um distúrbio na diferenciação terminal de linfócitos B. As observações recentes indicam que a via PD-1/PD-L1 podem influenciar na diferenciação de linfócitos B, sugerem uma necessidade de estudo desta via nesses pacientes.

Por ser uma doença complexa e heterogênea, buscamos homogeneizar o grupo de pacientes a ser estudado, e optamos por selecionar pacientes com ICV que apresentem manifestações não infecciosas gastrointestinais, e como controle, utilizamos indivíduos saudáveis e pacientes com ICV apenas com infecções de repetição, que fazem parte de outro estudo do nosso grupo.

O estudo do envolvimento da via PD-1/PD-L1 nos pacientes com ICV pode melhorar compreensão dos mecanismos dessa doença e sugerir possíveis novas formas terapêuticas a serem aplicadas.

3. HIPÓTESE

A expressão das moléculas PD-1/PD-L1 nos diferentes subtipos de linfócitos B está alterada em pacientes com Imunodeficiência Comum Variável, interferindo na diferenciação terminal destas células, levando a uma falha na produção de anticorpos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral:

Avaliar a expressão de PD-1 e PD-L1 nas diferentes subpopulações de linfócitos B de indivíduos com Imunodeficiência Comum Variável (ICV) com manifestações não infecciosas gastrointestinais e comparar a pacientes com ICV e infecções apenas e controles normais.

4.1.1. Objetivos Específicos:

1. Estudar a expressão de PD-1/PD-L1 nas diferentes subpopulações de linfócitos B e identificar possíveis alterações que justifiquem falhas na diferenciação terminal de linfócitos B dos pacientes com ICV em células mononucleares do sangue periférico;
2. Observar possíveis alterações de expressão destas moléculas em pacientes com ICV e diferentes manifestações não infecciosas gastrointestinais: hipertensão portal, padrão celíaco, diarreia crônica, neoplasia gástrica.

5. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Desenho do Estudo

Este trabalho foi desenvolvido como um estudo prospectivo de corte transversal, com a participação voluntária dos sujeitos da pesquisa.

5.2. Locais do estudo

O estudo envolveu pacientes com diagnóstico de Imunodeficiência Comum Variável (ICV) acompanhados no ambulatório de Imunodeficiências Primárias do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Investigação Médica (LIM 60) da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia da FMUSP.

5.3. Casuística

Foram incluídos neste estudo pacientes com diagnóstico de Imunodeficiência Comum Variável (ICV), acompanhados no Ambulatório de Imunodeficiências Primárias do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do HC-FMUSP. Os critérios diagnósticos utilizados estão de acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1997) e Grupo Panamericano de Imunodeficiências (PAGID) (Conley et al., 1999) e ESID. Esses pacientes foram divididos em subgrupos e selecionados vinte e nove pacientes do grupo com diagnóstico de ICV e doenças gastrintestinais. Para comparação entre os grupos, estudamos outro subgrupo de pacientes composto por quatorze pacientes com ICV e infecções de repetição apenas além de, adicionarmos um terceiro grupo que denominamos de Controle representado por vinte e quatro indivíduos saudáveis que, assim foram classificados por não apresentarem nenhuma doença descrita durante anamnese.

Critérios de inclusão:

- pacientes com idade entre 18 a 60 anos, de ambos os gêneros com diagnóstico de ICV, sendo um subgrupo que apresenta manifestações gastrointestinais e outro subgrupo que apresenta infecções apenas.
- Pacientes que apresentem frequência igual ou superior de 1% de linfócitos B (CD19⁺)

Critérios de exclusão:

- pacientes com infecções graves agudas
- pacientes grávidas
- pacientes em tratamento de doenças malignas na ocasião da coleta.

5.4. Recrutamento

Todos os voluntários participantes deste estudo leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Anexo 1**), aprovado pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq), do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo – CAAE: 58699416.2.0000.0068 número do parecer – 1.752.240) (**Anexo 2**).

5.4.1. Seleção e avaliação dos pacientes

Os pacientes com ICV são acompanhados no Ambulatório de Imunodeficiências primárias do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do HC-FMUSP e comparecem mensalmente ao Serviço para receber a infusão de Imunoglobulina Intravenosa (IGIV). Dentre estes pacientes, vinte e nove pacientes que apresentam também alguma manifestação gastrointestinal foram convidados a participar do estudo assim como, quatorze pacientes com ICV e infecções de repetição apenas e suas amostras de sangue foram coletadas, processadas e criopreservadas no LIM60.

5.4.2. Coleta das amostras

Foram coletados 40 mililitros (mL) de sangue periférico por punção venosa em membro superior de cada indivíduo participante do estudo, após cuidadosa assepsia local.

Foi utilizada a técnica de coleta a vácuo na qual é feita a punção da veia do paciente permitindo que o sangue flua diretamente para o tubo de coleta a vácuo contendo Ácido Cítrico Citrato de Sódio e Dextrose (ACD). Esta técnica é ideal, pois possibilita a coleta de vários tubos e se caracteriza por ser um sistema fechado e sem a necessidade de contato com a amostra.

O material foi coletado no Ambulatório de Imunodeficiências primárias do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do HC-FMUSP antes dos pacientes receberem a infusão de Imunoglobulina Intravenosa (IGIV) e levados para serem processados no mesmo dia ao Laboratório de Investigação Médica 60 (LIM60) da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados em cabine de segurança biológica devidamente esterilizada. Foi realizada a separação das células mononucleares e posterior criopreservação em nitrogênio líquido.

5.4.2.1. Processo de separação das células mononucleares do sangue periférico (CMSP)

Em cabine de segurança biológica nível 2, esterilizada por 15 minutos através da utilização de luz ultravioleta (UV), os 40mL de sangue coletados de cada voluntário foram diluídos separadamente com Solução Tampão Salina balanceada de Hank's (HBSS) (Gibco™) na mesma proporção.

Em 3 tubos de fundo cônico de 50mL, devidamente identificados, foi adicionado em cada um deles 15mL de Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, United Kingdom) (Baerlocher, 2002); Com estes tubos inclinados a 45°C foi acrescentado cuidadosamente pelas paredes de cada um dos tubos cônicos a amostra diluída em HANKS criando uma interface entre o Ficoll-Paque™ PLUS e a amostra de sangue diluída, sem homogeneização do tubo. Estes foram centrifugados por 40 minutos a 300xg em temperatura de 18 a 20°C, sem utilização de freio ao final da centrifugação.

Após a centrifugação, as células se separaram pela diferença de densidade de gradiente, e a camada de interesse com as células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foi aspirada e transferida para um novo tubo de fundo cônico, devidamente identificado. Em seguida foi adicionado HANKS à camada de CMSP, completando o volume de 50mL e procedida à centrifugação a 250xg por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e as células novamente lavadas com HANKS e centrifugadas nas mesmas condições anteriores, removendo-se posteriormente o sobrenadante, tendo a homogeneização do *pellet*.

As hemácias ainda presentes foram lisadas acrescentando 3mL de solução tampão de Lise ACK [com cloreto de amônia – 8,3g/L, EDTA disódico dihidratado – 0,0372 e bicarbonato de potássio – 1,0g/L (Gibco™)] por um período de 2 minutos. Para neutralizar a ação da solução de lise, após 3 minutos foi adicionado 10mL de meio de cultura R10, composto por: 500mL de meio de cultura RPMI 1640 (Gibco™), 50mL Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco™) inativado pelo calor, 5mL solução tampão Hepes 1M (Gibco™); 5mL L-Glutamina – 200mM (Gibco™), solução piruvato 100mM (Gibco™), 5mL penicilina e estreptomicina (Gibco™), 0,5mL 2-mercaptoetanol (Gibco™) e novamente foram centrifugados por 10 minutos a 250xg em temperatura de 18 a 20°C. O sobrenadante foi removido e o *pellet* formado foi cuidadosamente homogeneizado. Posteriormente foi acrescentado à amostra 10 mL de HANKS. A viabilidade celular foi definida através da utilização do corante azul de Tripán 1% (Sigma®), na diluição 1:10 e a correção da concentração celular estabelecida para 1×10^7 células/mL através da contagem realizada utilizando o contador de células automatizado *Countess*™ (Invitrogen).

Após os cálculos, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 250xg em temperatura de 18 a 20°C. As células foram ressuspensas no volume necessário de meio de congelamento, composto por 90% soro fetal bovino (GIBCO™), 10% dimetil sulfoxido (DMSO) (Hybri-Max®) e transferidas para criotubos específicos, armazenados no freezer - 80°C por aproximadamente 24 horas. Posteriormente, foram transferidos para o tanque de nitrogênio líquido.

Todas as amostras permaneceram estocadas no próprio LIM60 até o momento da realização dos experimentos.

5.4.2.2. Descongelamento das células mononucleares do sangue periférico criopreservadas.

Este procedimento foi realizado em cabine de segurança biológica nível 2, previamente esterilizado por 15 minutos através da utilização de luz UV.

Os criotubos foram retirados do tanque de nitrogênio líquido e mantidos em um isopor contendo gelo seco até o momento do seu descongelamento. As células contidas nos criotubos foram parcialmente descongelados em banho-maria a 37°C, em seguida, as células foram transferidas para tubo de fundo cônico contendo 9mL de meio de cultura R10 previamente identificados. Para realização da lavagem do criotubo foi adicionado mais 1mL de R10 e este volume foi transferido para o tubo que estava a amostra.

Em seguida, o tubo foi centrifugado por 10 minutos a 250xg em temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e o botão celular homogeneizado e ressuspendido em 2mL meio de cultura R10 para realização da contagem celular através do contador de células automatizado *Countess*TM (Invitrogen) utilizando o mesmo procedimento e cálculos descritos anteriormente, considerando-se apenas o valor obtido a partir de células vivas.

Novamente o tubo foi centrifugado e as células ressuspendidas em R10 no volume de $1,0 \times 10^6$ células/mL e as células foram transferidas respectivamente para uma placa de 96 poços com fundo em V (NUNC® Brand Products), previamente identificada.

5.5. Imunofenotipagem de superfície celular em células mononucleares do sangue periférico

Com o objetivo de caracterizar as populações celulares presentes nas amostras de células mononucleares do sangue periférico, as amostras coletadas foram processadas para realização da imunofenotipagem de superfície celular através da técnica de citometria de fluxo para avaliação fenotípica.

Após as células serem transferidas respectivamente para duas placas de 96 poços com fundo em V (NUNC® Brand Products), previamente identificadas, uma Painele Linfócitos B (LB) e outra Painele de Linfócitos T foliculares (LTfh); As placas seguiram para centrifugação a 250xg por 5 minutos, para a realização da lavagem celular, o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspendidas em 170µL de Tampão MACS, composto por 498mL de tampão salina fosfatada 7,2 (GIBCOTM) (PBS 1x), 2mL de EDTA [500mM], 2,5g de albumina de

soro bovino (SIGMA®) (BSA); Seguida de uma segunda centrifugação, onde sobrenadante foi desprezado.

Para iniciar a marcação das proteínas presentes na superfície das células foram adicionados os anticorpos conjugados com seus respectivos fluorocromos, de acordo com os painéis descritos na **Tabela 5** – Células B e suas subpopulações e **Tabela 6** – LTfh, além co-expressão das moléculas PD-1 e seu ligante PD-L1, juntamente com o marcador “live/dead” utilizado para verificar a viabilidade celular.

A fim de evitar possíveis contestações, como critério de exclusão na análise por citometria de fluxo, utilizamos o *Dump channel* que nada mais é do que um canal utilizado como “lixo”, onde utilizamos o mesmo fluorocromo para marcar todas as células que não são do nosso interesse entretanto, também expressam as proteínas PD-1 e PD-L1; Neste trabalho foi necessário excluir os monócitos caracterizados pela expressão de CD14⁺ assim como também excluimos as células *Natural Killer* (NK) caracterizadas pela expressão das moléculas CD16⁺ e CD56⁺.

Após a adição dos reagentes, as células permaneceram sob incubação por 30 minutos no escuro a 4°C. Ao término da incubação as placas foram centrifugadas a 250xg por 5 minutos, o sobrenadante foi desprezado e as células foram lavadas com 170µL de tampão MACS, seguindo novamente para centrifugação, por duas vezes.

Finalizando, a técnica de imunofenotipagem de superfície celular, foram adicionados 100µL de paraformaldeído a 1% (PFA 1%), composto por 9mL de PBS (1x) e 1mL de paraformaldeído 10x (SIGMA®), visando promover a fixação dos anticorpos monoclonais utilizados.

As células foram transferidas, respectivamente para microtubos (Fisherbrand®, Houston, TX) previamente identificados e permaneceram armazenadas sob-refrigeração na geladeira a 4°C até o momento da leitura no citômetro de fluxo modelo LSRFortessa™ X-20 (BD Bioscience), disponível no LIM60, dotado de detectores capazes de adquirir e analisar eventos com até 18 cores.

5.5.1. Preparação das beads para ajuste da voltagem do aparelho

Em cabine de segurança biológica nível 2, previamente esterilizada por 15 minutos através da utilização de UV, em um microtubo foram adicionados 1600µL de Tampão MACS, duas gotas de *Negative Control* (FBS) (BD™) e duas gotas de *Anti-Mouse*

Ig, κ (BD™), 100 μ L deste homogeneizado foi distribuído em outros 14 microtubos previamente identificados, com os nomes dos fluorocromos utilizados. Em cada um destes microtubos foram adicionados, individualmente, os anticorpos monoclonais correspondentes aos fluorocromos utilizados.

Ao início da leitura no Citômetro de Fluxo, foram primeiramente utilizadas as amostras não marcadas (NM), possibilitando a definição da localização correta da população de interesse através dos parâmetros de *Forward Scatter* (FSC) tamanho celular e *Side Scatter* (SSC), granularidade celular, além da definição do limite das células que emitem fluorescência das que não emitem nenhuma fluorescência, e posteriormente, as beads, que possibilitam a realização do melhor ajuste das voltagens de emissão de fluorescência ideal para cada fluorocromo, descritos na **Tabela 4**.

Tabela 4: Informações sobre o comprimento de onda de excitação e de emissão dos fluorocromos conjugados aos anticorpos monoclonais utilizados.

Fluorocromo	Comprimento de Excitação	Comprimento de Emissão
FITC	488nm *	520nm *
PE	561nm*	585nm *
PerCPCy.5	488nm *	695nm *
BV421	405nm *	450nm *
BV510	405nm *	525nm *
BV605	405nm *	610nm *
BV650	405nm *	670nm*
BV711	405nm *	710nm*
BV786	405nm *	780nm *
APC	640nm *	670nm *
APC-R700	640nm *	730nm *
APC-H7	640nm *	780nm *
BUV395	355nm *	450nm *
INDO-1	355nm *	530nm*

Fonte: Próprio autor

Realizado então o ajuste definitivo de cada voltagem, o aparelho tornou-se apto a adquirir as demais amostras, referentes a cada painel. Para a realização do estudo de cada

painel foram adquiridos no gráfico inicial de FSC x SSC aproximadamente 500.000 de eventos de cada amostra, sendo cada evento correspondente a uma célula.

5.5.2. Estratégia de análise para caracterização das células B e suas respectivas subpopulações com a co-expressão das moléculas PD-1 e PD-L1

Para a Imunofenotipagem das células B partimos de linfócitos B totais e as subpopulações: LB Transicional, LB Naive, LB de memória sem troca de classe de imunoglobulina, LB de memória com troca de classe de imunoglobulina, Plasmoblasto e a co-expressão das moléculas PD-1 e PD-L1 utilizamos os anticorpos monoclonais descritos na **Tabela 5**.

Tabela 5: Informações sobre os anticorpos monoclonais utilizados imunofenotipagem de superfície das subpopulações de linfócitos B e co-expressão das moléculas PD-1 e seu ligante PD-L1.

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Marca
CD3	PErCP-Cy5.5	UCHT1	*BD
CD19	PE	HIB19	*BD
CD20	APC-H7	L27	*BD
CD21	BV650	B-ly4	*BD
CD24	BV711	ML5	*BD
CD27	APC-R700	M-T271	*BD
CD38	FITC	HIT2	*BD
CD138	BV510	MI15	*BD
IgD	BV605	IA6-2	*BD
IgM	APC	G20-127	*BD
CD14	BUV395	MφP-9	*BD
CD16	BUV395	3G8	*BD
CD56	BUV395	NCAM16.2	*BD
PD-1	BV421	MIH4	*BD
PD-L1	BV786	MIH1	*BD

* BD (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA)

Fonte: Próprio autor

Após a compensação das voltagens do citômetro, inicialmente delimitamos a área denominada por *Time*, para eliminar possíveis oscilações do laser que possam ocorrer durante a aquisição. Nessa estratégia, coloca-se no eixo da ordenada o parâmetro PE, sendo este o detector mais sensível, e no eixo da abscissa a opção *Time* para então, delimitar a região mais contínua.

A partir de então, utilizamos o parâmetro de “Singlets”, que permite separar apenas as células que passaram uma a uma em frente ao laser num fluxo contínuo, eliminando as células que passaram juntas e assim, eliminamos dados errôneos. Para isso, foi delimitado no eixo da ordenada o parâmetro *Foward Scatter-Height* (FSC-H) e na abscissa, *Foward Scatter-Area* (FSC-A). Foi determinada a região em diagonal com os eventos mais condensados. Na sequência uma janela de aquisição de linfócitos totais (FSC-A x SSC-A) dentro do “gate” de “Singlets”, que seguiu de uma janela composta por células vivas separadas das células mortas chamada de *Vivas* (*Live/Dead* x SSC-A) e posteriormente nós analisamos a nossa população de interesse – as células B através do *gate* delimitado na janela de cruzamento dos marcadores CD3 negativo x CD19 positivo característico da população de linfócitos B. A partir do *gate* de células B nós observamos a expressão das moléculas que caracterizam as subpopulações de linfócitos B (CD20, CD24, CD27, CD38, CD138, IgD e IgM). A partir daí outras seis janelas de aquisições foram feitas a fim de caracterizar as subpopulações de células B de acordo com seu estágio de desenvolvimento conforme fenótipo descrito na sequência:

- 1) Linfócito B (CD19⁺)
- 2) Linfócito B Transicional (CD19⁺CD24⁺CD38⁺)
- 3) Linfócito B Naive (CD19⁺CD20⁺IgD⁺CD27⁻)
- 4) Linfócito B de memória sem troca de classe de imunoglobulina (CD19⁺CD20⁺IgD⁺CD27⁺)
- 5) Linfócito B de memória com troca de classe de imunoglobulina (CD19⁺CD20⁺IgD⁻CD27⁺CD38⁺)
- 6) Plasmoblasto (CD19⁺IgD⁻CD27⁺CD20⁻CD38⁺).

Todo esse processo da estratégia de análise citado acima pode ser observado no esquema da **Figura 5** :

Figura 5. Estratégia de análise. Estratégia para análise da expressão das moléculas de linfócitos B. Primeiramente foi feita uma janela de aquisição na região denominada de *time* caracterizando a não oscilação do laser. Na sequência foi feita uma janela de aquisição na região das células que passaram apenas uma vez em frente ao laser, denominados *singlets* determinado pelo tamanho em relação a altura (FSC-H) e em relação a área (FSC-A). Em seguida foi feita uma janela de aquisição na população de linfócitos totais seguido de uma janela de aquisição na população de células vivas denominadas *live dead* e posteriormente foi feita uma janela de aquisição na população denominada CD19+. A partir daí, selecionamos as subpopulações de linfócitos B através da expressão das moléculas CD20, CD24, CD27, CD38, CD138, IgD e IgM.

Posteriormente a identificação das células B, identificamos a co-expressão das moléculas PD-1 e PD-L1 nas subpopulações de células B (**Figura 6**).

Figura 6: Estratégia de análise para avaliar a co-expressão das moléculas PD-1 e PD-L1 nas subpopulações de linfócitos B. A partir das subpopulações de linfócitos B e dentro de cada uma delas, foi feita uma janela de identificação para avaliar a expressão das moléculas PD-1 e PD-L1.

5.5.3. Estratégia de análise para população de linfócitos T foliculares

Para imunofenotipagem dos linfócitos T foliculares (LTfh) em amostras de CMSP utilizamos o painel descrito na Tabela 06.

Tabela 6: Informações sobre os anticorpos monoclonais utilizados imunofenotipagem de superfície dos Linfócitos Tfh.e a co-expressão da molécula PD-1

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Marca
CD3	PErCP-Cy5.5	UCHT1	*BD
CD4	APC.Cy7	RPA-T4	*BD
CD8	BV510	SK1	*BD
CD14	BUV395	MφP-9	*BD
CD16	BUV395	3G8	*BD
CD56	BUV395	NCAM16.2	*BD
CD19	PE	HIB19	*BD
CXCR5	BB515	RF8B2	*BD
PD-1	BV421	MIH4	*BD

PD-L1

BV-786

MIH1

*BD

* BD (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA)

Fonte: Próprio autor

Utilizamos o marcador de viabilidade “*live/dead*” (Life/Invitrogen) para exclusão de morte celular conforme tabela abaixo (**Tabela 7**).

Tabela 7: Anticorpo monoclonal característico de viabilidade celular para exclusão de células mortas

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Marca
<i>Live/Dead</i>	Indo-I	—	*Life

* Life (Life/Invitrogen)

Fonte: Próprio autor

De forma similar ao descrito acima para células B, a estratégia de análise para caracterizar a população de linfócitos T foliculares (LTfh) na marcação das CMSP foi realizada da seguinte maneira: “Time” (PE x Time) delimitando a população aonde não houve oscilação do laser, seguido de “Singlets” – FSC-H x FSC-A, aonde selecionamos apenas os eventos que passaram isoladamente no feixe do laser. Então, seguiu-se para definição da população de linfócitos totais (FSC-A x SSC-A), seguindo para janela de células vivas excluindo as células mortas (SSC-A x *Live/Dead*).

A partir da população de células vivas e a critério da estratégia de análise quanto a população avaliada, também foram utilizados os marcadores CD3 característico de linfócitos T versus CD14/CD16 e CD56 marcadores de monócitos e células NK respectivamente pois, estas populações celulares também expressam a molécula PD-1 a fim de evitar possíveis contestações.

Na sequência temos a janela linfócitos T foliculares caracterizados pela expressão das moléculas CD4 x CXCR5 e por fim PD-1.

Abaixo é possível observar a estratégia dessa análise representada na Figura 7:

Figura 7. Estratégia de análise. Estratégia para análise da expressão das moléculas de linfócitos Tfh. São selecionadas apenas células que passaram individualmente pelo citômetro com base nos gráficos determinados pelos parâmetros “FSC-H” e “FSC-A”. Selecionamos a população de linfócitos totais, a partir dos parâmetros “SSC-A” e “FSC-A” (D) Para analisar apenas os linfócitos T verificamos o *gate* CD3⁺/CD19⁻. A partir daí, selecionamos as subpopulações de linfócitos T (CD4/CD8) e observamos a expressão das moléculas CD4/CXCR5/PD-1 de linfócitos Tfh no sangue periférico.

Neste trabalho, para identificar exatamente os *gates* delimitadores das populações celulares a partir de múltiplos fluorocromos utilizamos o método de separação das fluorescências sem uma marcação, denominado FMO (*fluorescence minus one*), usado para interpretar os dados de citometria de fluxo⁴⁶.

Testes de controle de qualidade no equipamento foram realizados, para assegurar a qualidade e objetividade dos experimentos. A análise dos dados foi realizada no programa FlowJo v10 (FlowJo Software, Tree Star, Ashland, OR), específico para análises de citometria

de fluxo. Todas as técnicas de citometria foram realizadas com controles positivos e negativos.

5.6. Análise de citometria

A análise dos dados adquiridos a partir de cada amostra foi realizada através do software *FlowJo* v.10 (Tree Star®, Inc., Ashland, OR, EUA) versão 10, transformando a representação gráfica gerada a partir da captação da intensidade das cores, em porcentagens dos resultados finais, na subpopulação pré-selecionada, baseada nas suas propriedades físicas de dispersão frontal e lateral da luz.

Posteriormente estes valores foram transferidos para uma planilha de dados do programa *Microsoft Office Excel* 2007 (*Microsoft Corporation*, EUA).

5.7. Exames laboratoriais

Os exames laboratoriais de rotina foram realizados no Laboratório Central do HC-FMUSP. Foram realizados exames de dosagem das imunoglobulinas: IgG, IgA, IgM.

5.8. Análise estatística

Os resultados dos ensaios laboratoriais foram analisados descrevendo o comportamento das subpopulações de linfócitos B (Naive, Transicional, Memória sem troca de classe de imunoglobulina, Memória com troca de classe de imunoglobulina e Plasmoblasto) e dos linfócitos T foliculares juntamente com a co-expressão dos marcadores PD-1 e PD-L1.

A análise estatística dos dados foi realizada com o auxílio do programa estatístico *GraphPad PRISM* versão 8 para Windows (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Os grupos foram comparados utilizando modelos não paramétricos, os dados são relatados como mediana (M) e intervalo interquartil (IQR). Comparações entre grupos foram realizadas usando *test t* e teste não-paramétrico *Mann-Whitney* para comparar um parâmetro entre dois grupos, o teste ANOVA não-paramétrico para comparar um parâmetro entre três grupos e o teste de Comparações Múltiplas de *Dunn's*. Para todos os testes, foi adotado um nível de

significância de 0,05 ($\alpha=5\%$), onde os valores descritivos (p) abaixo desse valor foram considerados significativos.

5.9. Aspectos éticos

A participação de voluntários neste projeto esteve condicionada a leitura, compreensão e assinatura de TCLE, tendo sido informados que poderiam retirar o consentimento para participar do estudo a qualquer momento, sem que os seus direitos a assistência médica e demais cuidados de saúde fossem prejudicados.

Os voluntários não foram submetidos a qualquer forma de intervenção experimental envolvendo drogas ou vacinas, havendo apenas os riscos inerentes à punção venosa, que raramente podem causar dor, hiperemia local ou um pequeno hematoma.

6. RESULTADOS

As amostras deste estudo foram coletadas entre 2017 e 2018. No total, foram incluídos 67 voluntários.

No caso dos 29 pacientes alocados no grupo de Pacientes com Imunodeficiência Comum Variável com manifestações não infecciosas gastrointestinais (ICV - GI) e dos 14 pacientes com ICV sem complicações (ICV- S/C) foram levantadas informações referentes à idade, sexo, manifestações clínicas e imunofenotipagem de células B (CD19⁺), assim como dosagem das imunoglobulinas IgG, IgA e IgM.

Para a avaliação dos 24 indivíduos alocados no grupo Controles Saudáveis (CTRL), foram coletados os dados de idade e sexo.

A análise estatística dos dados encontrados nos grupos foi feita a partir dos valores de frequência em porcentagem. Para uma melhor observação do perfil imunológico dos pacientes com ICV e doença gastrointestinal deste estudo, consideramos importante subdividir os pacientes em 4 subgrupos:

- a. Padrão celíaco (PC): pacientes que apresentam à biópsia de 2^a porção de duodeno alterações compatíveis com doença celíaca (linfocitose intraepitelial >40%, atrofia de vilos e redução da relação vilo-crípta)
- b. Hipertensão portal (HP): pacientes que apresentam hipertensão portal (calibre da veia porta >1,2 cm, esplenomegalia ou evidência de hiperesplenismo, e/ou presença de varizes de esôfago e/ou gastropatia hipertensiva e/ou ascite não neoplásica, ou circulação colateral do eixo espleno-portal)
- c. Diarreia crônica (DC): pacientes portadores de diarreia crônica não celíaca como doença inflamatória intestinal (doença de Crohn, retocolite ulcerativa, colite microscópica)
- d. Neoplasia gastrointestinal (NG): pacientes que apresentaram neoplasia gástrica (já tratada)

6.1. Dados Demográficos, clínicos e laboratoriais

Com relação à idade, a média foi de 43,6 anos no grupo de pacientes ICV- GI, 38,7 anos no grupo ICV-S/C e 31,6 anos no grupo CTRL (p= 0.2371). No grupo ICV-GI 15 (51,7%) eram do sexo masculino e 14 (48,3%) do sexo feminino. No grupo ICV-S/C, 3 (21,4%) eram masculinos e 11(78,6%) femininos. No grupo controle, 10 (41,7%) eram do

sexo masculino e 14 (58,3%) do sexo feminino. As características demográficas dos grupos estão descritas na tabela 3.

Tabela 8: Características demográficas dos grupos: pacientes ICV com complicações não infecciosas gastrointestinais (ICV-GI), e ICV sem complicações (ICV-S/C) e grupo controle (CTRL).

Variável	ICV-GI (n= 29)	ICV-S/C (n= 14)	CTRL (n=24)	P
Idade em anos (Mediana e Interquartil 25% - 75%)	36 (34-52,50)	41 (26,25-46,50)	36 (27,25-52,50)	P= 0.2371
Feminino	37	38	40	P= 0.9078
Masculino	28,50	42	29	P= 0.1076

Gênero (%)

Feminino	48,28	78,57	58,33
Masculino	51,72	21,43	41,67

*Variáveis contínuas apresentadas como medianas e intervalos interquartis; comparações realizadas com o teste Comparação Múltipla de Dunn's

Ao analisarmos as características da imunodeficiência relacionadas à idade de início dos sintomas, idade ao diagnóstico, intervalo entre início dos sintomas e diagnóstico (dT) e tempo de doença, não observamos diferença estatística entre o grupo ICV com manifestações gastrointestinais e ICV sem complicações (tabela 4).

Tabela 9: Características da doença Imunodeficiência Comum Variável dos pacientes ICV com alterações gastrointestinais (ICV-GI) e ICV sem complicações (ICV-S/C) participantes deste estudo.

	ICV-GI	ICV-S/C	p
Início dos sintomas	12 (5-25)	14 (5-22,50)	0.7199
Diagnóstico	31 (21-39)	24,50 (15,75-45)	0.3127
δT	14 (3,50-23)	11,50 (5-18,50)	0.6490

Tempo de doença	26 (13,50-41,50)	23,50 (13,75-29)	0.4373
------------------------	------------------	------------------	--------

Entre as manifestações clínicas da imunodeficiência comum variável, as infecções estavam presentes em 100% dos grupos ICV-GI e 100% do grupo ICV-S/C. Doenças autoimunes estavam presentes em 62% dos pacientes com ICV-GI, neoplasias em 100% e gastrointestinais em 62%. Na tabela 5 podemos observar as principais características clínicas dos pacientes participantes deste estudo com as infecções e complicações não infecciosas da ICV: doenças autoimunes, linfoproliferação, neoplasias.

Tabela 10: Manifestações infecciosas e não infecciosas apresentadas pelos pacientes ICV com complicações gastrointestinais (ICV-GI) e ICV sem complicações (ICV-S/C) participantes deste estudo.

	ICV-GI (n=29)	ICV – S/C (n=14)
	n/%	
Infecções	29(100%)	14(100%)
Infecções respiratórias altas	22 (75,9%)	13 (92,8%)
Pneumonias	25 (96,6%)	12 (85,7%)
Diarreia Infecciosa	10 (34,5%)	4 (28,6%)
Outras	4 (13,8%)	2 (14,3%)
Doenças Autoimunes/inflamatórias	18(62%)	-
PTI	4 (13,8%)	-
AHAI	1 (3,4%)	-
Anemia Megaloblástica	4 (13,8%)	-
Vitiligo	1 (3,4%)	-
Padrão Celíaco	10 (34,5% %)	-
Síndrome Sjogren	1 (3,4%)	-
Vasculite	1 (3,4%)	-
Doença Inflamatória Intestinal	1 (3,4%)	-
Hipertensão Portal	11 (37,9%)	-
Linfoproliferação Benigna	19 (65,5%)	-

Doenças Malignas	4(13,8%)	-
Neoplasia Gástrico	4 (13,8%)	-
Carcinoma basocelular	1 (3,4%)	-
Melanoma	1 (3,4%)	-
Alergia	18(62%)	9 (64,3%)

Os pacientes com ICV fazem reposição de imunoglobulina humana mensalmente e, coletam amostra de sangue periférico para exames de rotina de acordo com os protocolos do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do HC-FMUSP. Entre eles, são realizados hemograma, dosagem de imunoglobulinas e imunofenotipagem de células T, B e NK analisados no Laboratório Central do Hospital das Clínicas – DLCHC/FMUSP.

Para este estudo, foram selecionados pacientes com ICV sendo incluídos somente aqueles com frequência de linfócitos B (CD19⁺) acima de 1% no sangue periférico.

6.2. Avaliação da frequência de linfócitos B e suas subpopulações em células mononucleares do sangue periférico, e expressão de PD-1 e PD-L1

A caracterização fenotípica dos linfócitos B foi realizada por Citometria de Fluxo. De acordo com a fase de maturação, as populações celulares foram subdivididas em seis estágios:

- 1) Linfócito B (CD19⁺) total
- 2) Linfócito B Naïve (CD19⁺CD20⁺IgD⁺CD27⁻)
- 3) Linfócito B Transicional (CD19⁺CD24⁺CD38⁺)
- 4) Linfócito B de memória sem troca de classe de imunoglobulina (CD19⁺CD20⁺IgD⁺CD27⁺)
- 5) Linfócito B de memória com troca de classe de imunoglobulina (CD19⁺CD20⁺IgD⁻CD27⁺CD38⁺) COMUTADADO??
- 6) Plasmoblasto (CD19⁺IgD⁻CD27⁺CD20⁻CD38⁺).

Os resultados obtidos serão descritos de acordo com a ordem de desenvolvimento dos LB seguindo uma lógica e facilitando sua interpretação. Além da frequência das subpopulações de LB, serão descritas em cada uma a frequência da coexpressão de PD-1 e

PD-L1 encontrados. Comparando, os pacientes ICV-GI com os indivíduos controles e também com os pacientes ICV-S/C. Ainda, subdividimos os pacientes ICV-GI de acordo com o tipo de manifestação gastrointestinal (PC – padrão celíaco; HP – hipertensão portal; DC – diarreia crônica; NG – neoplasia gastrointestinal) e comparamos esses subtipos entre eles e o grupo CTRL.

6.2.1. Frequência de Linfócitos B (CD19⁺) totais

Como já descrito, os pacientes ICV selecionados para este estudo apresentavam mais de 1% de linfócitos B totais nas imunofenotipagens em sangue periférico realizadas rotineiramente no ambulatório. Ainda assim, como nossas análises foram realizadas em células mononucleares de sangue periférico, iniciamos a avaliação a partir da frequência dos linfócitos B CD19⁺. Observamos menor frequência de células B CD19⁺ em células mononucleares de sangue periférico nos pacientes com ICV e complicação gastrointestinal (P= 0.0003) comparado ao grupo controle. Entretanto, observamos apenas uma tendência à redução de LB nos pacientes ICV sem complicações e não houve diferença entre os dois grupos de pacientes com ICV avaliados (Figura 8).

Figura 8: Porcentagem de células CD19⁺ (linfócitos B) em CMSP de pacientes ICV com complicação gastrointestinal (ICV-GI) e sem complicações (ICV-SC) em comparação com indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de

comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), $P < 0,0001$ (****)

Verificamos também a expressão de $CD19^+$ em CMSP nos subgrupos de pacientes com complicação gastrointestinal (figura 9). Comparados aos controles, houve redução estatisticamente significativa mais evidente no grupo de ICV com diarreia crônica ($p=0,0006$), mas também no grupo de ICV com hipertensão portal ($p=0,0342$). Nos demais grupos observou-se apenas uma tendência de redução.

Figura 9: Porcentagem de células $CD19^+$ (linfócitos B) em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV com complicação gastrointestinal em comparação a indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), $P < 0,0001$ (****). PC – padrão celíaco; HP – hipertensão portal; DC – diarreia crônica; NG – neoplasia gastrointestinal

6.2.1.1. Expressão de PD-1 em Linfócito B ($CD19^+$)

A análise da frequência de PD-1 nos linfócitos B $CD19^+$ mostrou redução significativa de PD-1 no grupo ICV com complicação GI em relação ao grupo controle ($P= 0,0372$), e apenas uma tendência a estar reduzido em relação ao grupo ICV sem complicações (figura 10).

Figura 10: Porcentagem de Linfócitos B $CD19^+$ com expressão de PD-1 em CMSP de pacientes ICV com complicação gastrointestinal (ICV-GI) e sem complicações (ICV-SC) em comparação com indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), $P < 0,0001$ (****)

Em seguida, avaliamos a frequência de PD-1 em linfócitos B $CD19^+$ nos subgrupos de pacientes com complicações gastrointestinais em comparação aos indivíduos CTRL, e apesar de tender à redução, não observamos diferença significativa da porcentagem de expressão de PD-1 em CMSP nos subgrupos de pacientes quando comparados a indivíduos CTRL (figura 11).

Figura 11: Porcentagem de linfócitos B $CD19^+$ com expressão de PD-1 em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV com complicação gastrointestinal em comparação a indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Não houve diferença estatística através do teste de Comparação Múltipla de Dunn's usando o teste estatístico Kruskal-Wallis. PC – padrão celíaco; HP – hipertensão portal; DC – diarreia crônica; NG – neoplasia gastrointestinal.

6.2.1.2. Expressão de PD-L1 em Linfócito B $CD19^+$

Nossas análises demonstram que a frequência de PD-L1 nos pacientes com complicações gastrointestinais foi significativamente menor em relação ao grupo controle ($P=0,0197$) e também aos pacientes sem complicações ($P=0,0152$), enquanto que o grupo CTRL e de ICV-S/C apresentaram resultado similar um ao outro (figura 12).

Figura 12: Porcentagem de PD-L1 em Linfócito B CD19⁺ em CMSP de pacientes ICV com complicação gastrointestinal (ICV-GI) e sem complicações (ICV-SC) em comparação com indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p <0,05 .(*), p <0,01 (**), P <0,001 (***), P <0,0001 (****)

Ao avaliar a expressão de PD-L1 nos subgrupos de pacientes com complicações gastrointestinais, observamos que, com exceção do subgrupo de neoplasia gastrointestinal, todos expressaram menos PD-L1 em relação ao grupo controle, PC (P= 0,0289), HP (P= 0,0408) e DC (P= 0,0209). Não observamos diferença estatística entre os subgrupos (figura 13).

Figura 13: Porcentagem de linfócitos B $CD19^+$ com expressão de PD-L1 em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV com complicação gastrointestinal em comparação a indivíduos CTRL nos subgrupos de pacientes ICV com GI em comparação ao grupo CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), $P < 0,0001$ (****). PC – padrão celíaco; HP – hipertensão portal; DC – diarreia crônica; NG – neoplasia gastrointestinal.

6.2.2. Frequência de Linfócitos B Transicionais ($CD19^+CD24^+CD38^+$)

A próxima subpopulação de linfócito B a ser avaliada foi LB Transicional que se caracteriza pela expressão de $CD19^+CD24^+CD38^+$. Observamos um importante aumento da frequência desta subpopulação de LB no grupo de pacientes ICV-GI quando comparados aos controles com ($P = 0,0003$). Observamos também aumento significativo no grupo ICV-S/C ($P = 0,0002$). Quando comparamos os dois grupos de ICV não constatamos diferença estatisticamente significativa. Estes dados podem ser observados na figura 14.

Figura 14: Porcentagem de linfócito B Transicional ($CD19^+CD24^+CD38^+$) em CMSP de pacientes ICV com complicação gastrointestinal (ICV-GI) e sem complicações (ICV-SC) em comparação com indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), $P < 0,0001$ (****)

Ao fazermos as análises entre os subgrupos de ICV-GI, não encontramos diferença estatística na frequência de LB transicionais. Porém, quando comparados ao grupo controle, diferença foi significativa para os subgrupos, PC ($P = 0,0207$) e HP ($P = 0,0008$), enquanto os outros subgrupos apresentaram apenas uma tendência da frequência de LB transicional estar aumentada em relação aos CTRL. (figura 15).

Figura 15: Porcentagem de linfócito B Transicional ($CD19^+CD24^+CD38^+$) em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICD com complicação gastrointestinal em comparação a indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), $P < 0,0001$ (****). PC – padrão celíaco; HP – hipertensão portal; DC – diarreia crônica; NG – neoplasia gastrointestinal.

6.2.2.1. Expressão de PD-1 em Linfócito B Transicional ($CD19^+CD24^+CD38^+$)

Nossas análises mostraram aumento significativo da expressão de PD-1 nos linfócitos B transicionais ($CD19^+CD24^+CD38^+$) nos pacientes ICD – GI e ICD-S/C quando comparados ao grupo controle $P = 0,0300$ e $P = 0,0005$, respectivamente. Este aumento de expressão foi mais importante no grupo ICD-S/C. Apesar de uma tendência à maior expressão de PD-1 no grupo ICD-S/C, não houve diferença estatística entre os grupos de ICD (figura 16).

Figura 16: Porcentagem de linfócitos B transicional ($CD19^+CD24^+CD38^+$) com expressão de PD-1 em CMSP de pacientes ICV com complicação gastrointestinal (ICV-GI) e sem complicações (ICV-SC) em comparação com indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), $P < 0,0001$ (****)

Quando os pacientes ICV-GI foram subdivididos em subgrupos, apesar de haver uma tendência do PD-1 ser mais frequente nesses indivíduos do que no grupo controle, não observamos diferença significativa (figura 17).

Figura 17: Porcentagem de linfócitos B Transicional ($CD19^+CD24^+CD38^+$) com expressão de PD-1 em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV com complicação gastrointestinal em comparação a indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram

representados por: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), $P < 0,0001$ (****). PC – padrão celíaco; HP – hipertensão portal; DC – diarreia crônica; NG – neoplasia gastrointestinal

6.2.2.2. Expressão de PD-L1 em Linfócito B Transicional (CD19⁺CD24⁺CD38⁺)

A expressão de PD-L1 na subpopulação de linfócitos B transicional (CD19⁺CD24⁺CD38⁺) foi praticamente idêntica em todos os grupos, estando a porcentagem desta molécula próxima a 100% em todos os grupos, não havendo diferença estatística (figura 18).

Figura 18: Porcentagem de linfócitos B transicional (CD19⁺CD24⁺CD38⁺) com expressão de PD-L1 em CMSP de pacientes ICV com complicação gastrointestinal (ICV-GI) e sem complicações (ICV-SC) em comparação com indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), $P < 0,0001$ (****).

6.2.3. Frequência de Linfócitos B Naïve (CD19⁺CD20⁺IgD⁺CD27⁻)

A fase seguinte de maturação dos LB são os Linfócitos B Naïve, cujo fenótipo é caracterizado pelos marcadores CD19⁺CD20⁺IgD⁺CD27⁻. Observamos um aumento

significativo na frequência deste subtipo de linfócito B nos pacientes com ICV de ambos os grupos quando comparados aos controles ($P < 0,0001$). Não constatamos diferença entre os dois grupos de pacientes com ICV, mas a frequência de LB naïve no grupo ICV-S/C tendeu a ser maior (figura 19).

Figura 19: Porcentagem de Linfócitos B Naïve ($CD19^+CD20^+IgD^+CD27^-$) em CMSP de pacientes ICV com complicação gastrointestinal (ICV-GI) e sem complicações (ICV-SC) em comparação com indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), $P < 0,0001$ (****).

Avaliamos também a frequência de LB naïve nos diferentes subgrupos de pacientes ICV-GI. A análise estatística demonstra que os subgrupos PC ($P = 0,0018$), HP ($P = 0,0142$) e DC ($P = 0,0021$) apresentam um aumento significativo de LB naïve em relação ao grupo CTRL, enquanto o subgrupo NG apresenta apenas uma tendência (figura 20).

Figura 20: Porcentagem de Linfócito B Naïve (CD19⁺CD20⁺IgD⁺CD27⁻) em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV com complicação gastrointestinal em comparação a indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's usando o teste estatístico Kruskal-Wallis. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p <0,05 (*), p <0,01 (**), P <0,001 (***), P <0,0001 (****) PC – padrão celíaco; HP – hipertensão portal; DC – diarreia crônica; NG – neoplasia gastrointestinal.

6.2.3.1. Expressão de PD-1 em Linfócito B Naïve (CD19⁺CD20⁺IgD⁺CD27⁻)

Ao avaliarmos a expressão de PD-1 em linfócitos B naïve não observamos diferença estatística entre os grupos ICV-GI, ICV-S/C quando comparados ao grupo controle. Também não houve diferença entre os dois grupos ICV (figura 21).

Figura 21: Porcentagem de Linfócitos B Naïve ($CD19^+CD20^+IgD^+CD27^-$) com expressão de PD-1 em CMSP de pacientes ICV com complicação gastrointestinal (ICV-GI) e sem complicações (ICV-S/C) em comparação com indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's usando o teste estatístico Kruskal-Wallis. Valores estatisticamente significantes foram representados por: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), $P < 0,0001$ (****)

Avaliamos também a frequência de expressão de PD-1 em linfócitos B Naïve ($CD19^+CD20^+IgD^+CD27^-$) nos subgrupos de pacientes ICV-GI comparando ao grupo CTRL. Não houve diferença significativa da expressão de PD-1 em linfócitos B Naïve em CMSP nos subgrupos quando comparados aos CTRL e também entre os subgrupos não houve diferença significativa (figura 22).

Figura 22: Porcentagem de Linfócito B Naïve ($CD19^+CD20^+IgD^+CD27^-$) com expressão de PD-1 em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV com complicação gastrointestinal em comparação a indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), $P < 0,0001$ (****) PC – padrão celíaco; HP – hipertensão portal; DC – diarreia crônica; NG – neoplasia gastrointestinal.

6.2.3.2. Expressão de PD-L1 em Linfócitos B Naïve ($CD19^+CD20^+IgD^+CD27^-$)

Não observamos diferença significativa na expressão de PD-L1 em linfócitos B naïve entre os grupos comparados. (figura 23).

Figura 23: Porcentagem de linfócitos B Naïve ($CD19^+CD20^+IgD^+CD27^-$) com expressão de PD-L1 em CMSP de pacientes ICV com complicação gastrointestinal (ICV-GI) e sem complicações (ICV-SC) em comparação com indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), $P < 0,0001$ (****)

Em seguida analisamos a frequência linfócitos B naïve com expressão de PD-L1 nos diferentes subgrupos de ICV-GI e comparamos com controles. Constatamos redução significativa apenas no subgrupo Padrão Celíaco (PC), quando comparado ao grupo controle ($P = 0,0132$). Também observamos redução significativa comparando o grupo PC com o grupo de neoplasias gastrointestinais ($P = 0,0211$). Comparando o grupo PC com os outros subgrupos de ICV-GI, observamos apenas uma tendência à redução da frequência linfócitos B naïve com expressão de PD-L1 (figura 24).

Figura 24: Porcentagem de Linfócito B Naïve ($CD19^+CD20^+IgD^+CD27^-$) com expressão de PD-L1 em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV com complicação gastrointestinal em comparação a indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), $P < 0,0001$ (****) PC – padrão celíaco; HP – hipertensão portal; DC – diarreia crônica; NG – neoplasia gastrointestinal.

6.2.4. Frequência de Linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina ($CD19^+CD20^+IgD^+CD27^+$)

A fase seguinte de maturação do LB a ser analisada foi LB de memória sem troca de classe de imunoglobulina, definidos em nosso trabalho pela expressão de $CD19^+CD20^+IgD^+CD27^+$. Habitualmente deveríamos utilizar a coexpressão de IgM na superfície dos linfócitos B, entretanto, tivemos um problema com nosso anticorpo, visando conter gastos utilizamos um frasco IgM já pertencente ao nosso grupo, o mesmo porém na análise do experimento não estava de acordo com o padrão normalmente apresentado, portanto, optamos por desconsiderar a utilização de IgM para não comprometer a análise da amostra. Observamos redução estatisticamente significativa na frequência destas células nos dois grupos de pacientes com ICV quando comparados ao grupo controle; sendo ICV-GI ($P = 0,0006$) e ICV-S/C ($P < 0,0001$). A comparação entre os grupos de pacientes ICV o grupo ICV-GI demonstrou uma tendência a apresentar quantidade maior de LB de memória sem troca (figura 25).

Figura 25: Porcentagem de linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina ($CD19^+CD20^+IgD^+CD27^+$) em CMSP de pacientes ICV com complicação gastrointestinal (ICV-GI) e sem complicações (ICV-SC) em comparação com indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's usando o teste estatístico Kruskal-Wallis. Valores estatisticamente significantes foram representados por: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), $P < 0,0001$ (****)

Ao subdividirmos os pacientes com complicações GI, apenas o subgrupo padrão celíaco apresentou redução significativa ($P = 0,0284$) em comparação ao grupo CTRL, enquanto que os outros subgrupos apresentam uma tendência de redução dessas células comparadas ao grupo CTRL (figura 26).

Figura 26: Porcentagem de linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina ($CD19^+CD20^+IgD^+CD27^+$) em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV com complicação gastrointestinal em comparação a indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), $P < 0,0001$ (****) PC – padrão celíaco; HP – hipertensão portal; DC – diarreia crônica; NG – neoplasia gastrointestinal.

6.2.4.1. Expressão de PD-1 em Linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina ($CD19^+CD20^+IgD^+CD27^+$)

A análise da frequência de linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina ($CD19^+CD20^+IgD^+CD27^+$) com expressão de PD-1 demonstra que os grupos de pacientes ICV não foram diferentes do grupo controle, entretanto, houve diferença significativa ($P = 0,0199$) na expressão de PD-1 quando comparamos os dois grupos de pacientes, sendo que o grupo ICV-GI apresentou menor frequência de células com este marcador comparado ao grupo ICV-S/C. A expressão de PD-1 em linfócitos B sem troca de classe de Imunoglobulina apresenta uma tendência a estar aumentada nos pacientes ICV-S/C em comparação aos CTRL (figura 27).

Figura 27: Frequência de Linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina ($CD19^+CD20^+IgD^+CD27^+$) com expressão de PD-1 em CMSP de pacientes ICV com complicação gastrointestinal (ICV-GI) e sem complicações (ICV-SC) em comparação com indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), $P < 0,0001$ (****)

A análise estatística da porcentagem de expressão de PD-1 na subpopulação de Linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina ($CD19^+CD20^+IgD^+CD27^+$) não demonstrou diferença significativa na expressão de PD-1 nos diferentes subgrupos de pacientes ICV-GI em comparação ao CTRL (figura 28).

Figura 28: Frequência Linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina ($CD19^+CD20^+IgD^+CD27^+$) com expressão de PD-1 em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV com complicação gastrointestinal em comparação a indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), $P < 0,0001$ (****). PC – padrão celíaco; HP – hipertensão portal; DC – diarreia crônica; NG – neoplasia gastrointestinal.

Expressão de PD-L1 em Linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina ($CD19^+CD20^+IgD^+CD27^+$)

Na análise dos nossos dados, a frequência de PD-L1 em linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina ($CD19^+CD20^+IgD^+CD27^+$) não apresentou diferença significativa na comparação de sua expressão nos grupos ICV-GI com grupo CTRL e ICV-S/C (figura 29).

Figura 29: Frequência de Linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina ($CD19^+CD20^+IgD^+CD27^+$) com expressão de PD-L1 em CMSP de pacientes ICV com complicação gastrointestinal (ICV-GI) e sem complicações (ICV-S/C) em comparação com indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), $P < 0,0001$ (****)

Na figura 30 podemos observar que não houve diferença significativa na expressão de PD-L1 na subpopulação de Linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina ($CD19^+CD20^+IgD^+CD27^+$) no subgrupo de pacientes ICV-GI e ICV-S/C em comparação aos CTRL.

Figura 30: Frequência de Linfócitos B de memória sem troca de classe de imunoglobulina ($CD19^+CD20^+IgD^+CD27^+$) com expressão de PD-L1 em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV com complicação gastrointestinal em comparação a indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), $P < 0,0001$ (****). PC – padrão celíaco; HP – hipertensão portal; DC – diarreia crônica; NG – neoplasia gastrointestinal.

6.2.5. Frequência de Linfócitos B de memória com troca de classe de imunoglobulina ($CD19^+CD20^+IgD^-CD27^+CD38^+$)

A população de LB de memória com troca de classe de imunoglobulina foi caracterizada com os anticorpos $CD19^+CD20^+IgD^-CD27^+CD38^+$. Observamos que pacientes ICV-GI apresentam redução na porcentagem destas células ($P = 0,0023$) em CMSP quando comparados ao grupo CTRL. No grupo ICV-S/C é possível notar uma tendência desta população estar reduzida nesses indivíduos em relação aos CTRL (figura 31). Não observamos diferença entre os dois grupos de pacientes estudados.

Figura 31: Frequência de linfócitos B de memória com troca de classe de imunoglobulina ($CD19^+CD20^+IgD^-CD27^+CD38^+$) em CMSP de pacientes ICV com complicação gastrointestinal (ICV-GI) e sem complicações (ICV-SC) em comparação com indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), $P < 0,0001$ (****) .

A análise estatística da frequência de Linfócitos B de memória com troca de classe de imunoglobulina nos subgrupos de pacientes ICV-GI mostra que apenas o subgrupo de pacientes ICV-GI com Hipertensão portal apresenta redução significativa em relação ao CTRL ($P = 0,0332$) (figura 32).

Figura 32: Frequência dos linfócitos B de memória com troca de classe de imunoglobulina ($CD19^+CD20^+IgD^-CD27^+CD38^+$) em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes IGV com complicação gastrointestinal em comparação a indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), $P < 0,0001$ (****). PC – padrão celíaco; HP – hipertensão portal; DC – diarreia crônica; NG – neoplasia gastrointestinal.

6.2.5.1. Expressão de PD-1 em Linfócitos B de memória com troca de classe de imunoglobulina ($CD19^+CD20^+IgD^+CD27^+$)

A análise da frequência de Linfócitos B de memória com troca de classe de imunoglobulina ($CD19^+CD20^+IgD^+CD27^+$) com expressão de PD-1 em CMSP não mostrou diferença significativa na frequência deste marcador nos pacientes IGV – GI em comparação aos CTRL e IGV-S/C (figura 33). Importante salientar que para análise da expressão de PD-1 consideramos apenas os indivíduos que apresentaram LB de memória com troca de classe de imunoglobulina, portanto, foram analisados 12 pacientes do grupo IGV-GI, 10 pacientes do grupo IGV-S/C. Todos os indivíduos do grupo CTRL apresentaram LB de memória.

Figura 33: Frequência de Linfócitos B de memória com troca de classe de imunoglobulina ($CD19^+CD20^+IgD^-CD27^+CD38^+$) com expressão de PD-1 em CMSP de pacientes ICV com complicação gastrointestinal (ICV-GI) e sem complicações (ICV-SC) em comparação com indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), $P < 0,0001$ (****).

Na sequência analisamos a frequência de linfócitos B de memória com troca de classe de imunoglobulina ($CD19^+CD20^+IgD^-CD27^+$) com expressão de PD-1 em CMSP nos diferentes subgrupos de ICV-GI e comparamos aos indivíduos CTRL. Não observamos diferença significativa da frequência de PD-1 nos subgrupos de ICV-GI (figura 34).

Figura 34: Frequência de Linfócitos B de memória com troca de classe de imunoglobulina ($CD19^+CD20^+IgD^-CD27^+CD38^+$) com expressão de PD-1 em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV com complicação gastrointestinal em comparação a indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), $P < 0,0001$ (****). PC – padrão celíaco; HP – hipertensão portal; DC – diarreia crônica; NG – neoplasia gastrointestinal.

6.2.5.2. Expressão de PD-L1⁺ em Linfócitos B de memória com troca de classe de imunoglobulina ($CD19^+CD20^+IgD^+CD27^+$)

Ao analisar a frequência de Linfócitos B de memória com troca de classe de imunoglobulina ($CD19^+CD20^+IgD^+CD27^+$) com expressão de PD-L1 não observamos diferença significativa na frequência deste tipo celular nos pacientes ICV-GI quando comparados ao grupo CTRL e ICV-S/C, porém há uma tendência dessa frequência ser menor nos pacientes ICV-GI (figura 35). Aqui também consideramos apenas os indivíduos que apresentaram LB de memória com troca de classe de imunoglobulina para analisar a expressão de PD-L1, portanto, foram analisados 12 pacientes do grupo ICV-GI, 10 pacientes do grupo ICV-S/C. Todos os indivíduos do grupo CTRL apresentaram LB de memória.

Figura 35: Frequência de linfócitos B de memória com troca de classe de imunoglobulina ($CD19^+CD20^+IgD^-CD27^+$) com expressão de PD-L1 em CMSP de pacientes ICV com complicação gastrointestinal (ICV-GI) e sem complicações (ICV-SC) em comparação com indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: $p < 0,05$.(*), $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), $P < 0,0001$ (****)

Posteriormente, quando os pacientes ICV-GI foram subdivididos em subgrupos também não foi possível observar diferença significativa na frequência de Linfócitos B de memória com troca de classe de imunoglobulina ($CD19^+CD20^+IgD^-CD27^+$) com expressão de PD-L1 quando comparados ao CTRL (figura 36).

Figura 36: Frequência de linfócitos B de memória com troca de classe de imunoglobulina ($CD19^+CD20^+IgD^-CD27^+$) com expressão de PD-L1 em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV com complicação gastrointestinal em comparação a indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), $P < 0,0001$ (****). PC – padrão celíaco; HP – hipertensão portal; DC – diarreia crônica; NG – neoplasia gastrointestinal.

Frequência de Plasmoblastos ($CD19^+IgD^-CD27^+CD20^-CD38^+$)

O plasmoblasto foi a última fase dos LB estudada nesse trabalho, e foram caracterizados utilizando $CD19^+IgD^-CD27^+CD20^-CD38^+$. Observamos redução significativa dos plasmoblastos nos dois grupos de pacientes com ICV quando comparados aos controles. A diferença foi mais expressiva no grupo de pacientes ICV-GI ($P = 0,0006$) do que nos pacientes ICV – S/C ($P = 0,0041$) (figura 37).

Figura 37: Frequência de Plasmoblastos ($CD19^+IgD^-CD27^+CD20^-CD38^+$) em CMSP de pacientes ICV com complicação gastrointestinal (ICV-GI) e sem complicações (ICV-S/C) em comparação com indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), $P < 0,0001$ (****).

Ao analisar a frequência de plasmoblastos nos subgrupos dos pacientes com complicações GI, notamos redução com diferença estatística apenas nos subgrupos com HP e DC, $P = 0,002$ e $P = 0,0389$, respectivamente, em relação aos CTRL. Os demais subgrupos não apresentam diferença significativa, porém mostram uma tendência a estarem com população de plasmoblastos reduzidas (figura 38).

Figura 38: Frequência de Plasmoblastos (CD19⁺IgD⁻CD27⁺CD20⁻CD38⁺) em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV com complicação gastrointestinal em comparação a indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: p <0,05 (*), p <0,01 (**), P <0,001 (***), P <0,0001 (****). PC – padrão celíaco; HP – hipertensão portal; DC – diarreia crônica; NG – neoplasia gastrointestinal.

6.2.5.3. Expressão de PD-1 em Plasmoblastos (CD19⁺IgD⁻CD27⁺CD20⁻CD38⁺)

Na sequência analisamos a frequência de plasmoblastos (CD19⁺IgD⁻CD27⁺CD20⁻CD38⁺) com expressão de PD-1 em CMSP nos pacientes com ICV-GI e comparamos aos indivíduos CTRL e ICV-S/C. Anteriormente, na análise de frequência de plasmoblastos observamos que alguns indivíduos não apresentaram plasmoblastos, portanto, a análise da expressão de PD-1 em plasmoblastos foi realizada respectivamente em: 17 indivíduos do grupo CTRL, quatro pacientes do grupo ICV-GI, e dois pacientes do grupo ICV-S/C. Como todos os resultados foram idênticos (não houve expressão de PD-1 em nenhum indivíduo) Não houve necessidade de teste estatístico (figura 39).

Figura 39: Frequência de Plasmoblastos ($CD19^+IgD^-CD27^+CD20^-CD38^+$) com expressão de PD-1 em CMSP de pacientes ICV com complicação gastrointestinal (ICV-GI) e sem complicações (ICV-SC) em comparação com indivíduos CTRL. Não houve necessidade de teste estatístico pois todos os resultados foram idênticos.

6.2.5.4. Expressão de PD-L1 em Plasmoblastos ($CD19^+IgD^-CD27^+CD20^-CD38^+$)

Na sequência analisamos a frequência de plasmoblastos ($CD19^+IgD^-CD27^+CD20^-CD38^+$) com expressão de PD-L1 em CMSP nos pacientes com ICV-GI e comparamos aos indivíduos CTRL e ICV-S/C. Anteriormente, na análise de frequência de plasmoblastos observamos que alguns indivíduos não apresentaram plasmoblastos, portanto, a análise da expressão de PD-L1 em plasmoblastos foi realizada respectivamente em: 17 indivíduos do grupo CTRL, quatro pacientes do grupo ICV-GI, e dois pacientes do grupo ICV-S/C. Não foi observado diferença estatística entre os grupos (figura 40).

Figura 40: Frequência de plasmoblastos ($CD19^+IgD^-CD27^+CD20^-CD38^+$) com expressão de PD-L1 em CMSP de pacientes ICV com complicação gastrointestinal (ICV-GI) e sem complicações (ICV-SC) em comparação com indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), $P < 0,0001$ (****)

6.2.6. Expressão de PD-1 nos diferentes tipos celulares da ontogenia dos LB

Para melhor avaliar as mudanças na expressão de PD-1 durante a ontogenia dos linfócitos B resolvemos comparar a frequência da expressão desta molécula entre as diversas subpopulações em cada grupo estudado e também entre eles.

Para melhor contrapor eventuais distúrbios de expressão, iniciamos a análise em controles (figura 41). Observamos que LB de memória sem troca de classe e plasmoblastos mostram uma redução significativa de PD-1 em comparação à LB transicional ($P = 0,0020$ e $P = < 0,0001$), LB naïve ($P = < 0,0001$ e $P = < 0,0001$) e LB de memória com troca de classe ($P = < 0,0001$ e $P = < 0,0001$) respectivamente. Ainda, constatamos dois grupos de expressão de PD-1 durante a ontogenia de LB: um grupo que engloba LB transitórias, LB naïve e LB de memória sem troca de isotipo e o outro grupo que engloba LB de memória com troca de isotipo e plasmoblastos. Não há diferença significativa na expressão de PD-1 intra-grupo, mas sim inter-grupos.

Figura 41: Porcentagem de expressão de PD-1 nas subpopulações de LB: LB transicional, LB naïve, LB de memória sem troca de classe, LB de memória com troca de classe, e plasmoblastos em CMSP do grupo CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), $P < 0,0001$ (****).

Em seguida, avaliamos a frequência de PD-1 nas subpopulações de LB nos pacientes com ICV-GI, objeto principal de nosso estudo. Observamos que a frequência dessa molécula, assim como nos controles, tende a diminuir conforme o LB vai se desenvolvendo, tendo uma redução significativa ($P = 0,0245$ e $P = 0,0013$) nos LB de memória com troca e plasmoblastos em comparação com os LB transicionais, e também de LB naïve para plasmoblastos ($P = 0,0247$) (figura 42).

Figura 42: Porcentagem de expressão de PD-1 nas subpopulações de LB: LB transicional, LB naïve, LB de memória sem troca de classe, LB de memória com troca de classe, e plasmoblastos em CMSP dos pacientes ICV – GI. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), $P < 0,0001$ (****).

Finalmente, fizemos a avaliação da frequência de expressão de PD-1 nos pacientes ICV-S/C. Observamos que PD-1 tem uma tendência a estar mais presente nos LB transicionais do que em relação aos outros subtipos de LB e que em comparação aos LB de memória com troca de classe é observado no LB transicional é uma diferença significativa (0,0205) (figura 43).

Figura 43: Porcentagem de PD-1 nas subpopulações de LB: LB transicional, LB naïve, LB de memória sem troca de classe, LB de memória com troca de classe, e plasmoblastos em CMSP dos pacientes ICV – S/C. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), $P < 0,0001$ (****).

Após avaliarmos cada grupo individualmente comparamos a frequência de PD-1 durante a ontogenia dos LB entre esses grupos, avaliando a frequência de PD-1 entre as subpopulações de LB e entre cada grupo. Observamos que PD-1 é mais expresso nos pacientes ICV-GI e ICV-S/C nas subpopulações de LB transicional, e tem uma tendência a estar mais expresso nos grupos de pacientes com ICV em LB naïve. Continuando na diferenciação dos LB os pacientes ICV-GI expressam menos PD-1 em LB de memória sem troca de classe em comparação aos ICV-S/C, enquanto os pacientes ICV-S/C tem uma tendência a expressar mais PD-1 nessas células em comparação aos CTRL. Posteriormente, ocorre uma queda na frequência dessas moléculas no LB de memória com troca de classe, porém sem diferença estatística entre os grupos, enquanto que nos plasmoblastos a produção de PD-1 é nula em todos os grupos estudados. Não houve diferença estatística da frequência de PD-1 entre os subtipos de LB (figura 44).

Figura 44: Porcentagem de PD-1 nas subpopulações de LB: LB transicional, LB naïve, LB de memória sem troca de classe, LB de memória com troca de classe, e plasmoblastos em CMSP dos grupos ICV-GI, CTRL e ICV-S/C. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), $P < 0,0001$ (****).

6.3. Frequências de linfócitos T foliculares (T_{FH}) em células mononucleares do sangue periférico.

Para a caracterização fenotípica dos linfócitos T_{FH} utilizamos a seguinte marcação: $CD3^+CD4^+CXCR5^+PD-1^+$.

Ao analisarmos frequência dos Linfócitos T_{FH} e constatamos que houve aumento significativo destas células nos pacientes dos dois grupos de ICV estudados em comparação ao grupo CTRL (ICV-GI - $P < 0,0001$ e ICV-S/C - $P = 0,0334$), entretanto, a diferença foi mais significativa no grupo de pacientes ICV-GI. Entre os grupos de pacientes ICV-GI e ICV-S/C não houve diferença significativa, apesar da tendência de ICV-GI apresentar maior frequência de LT_{FH} (figura 45).

Figura 45: Porcentagem de LT_{FH} ($CD4^+CXCR5^+PD-1^+$) em CMSP de pacientes ICV com complicação gastrointestinal (ICV-GI) e sem complicações (ICV-SC) em comparação com indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), $P < 0,0001$ (****).

Analizamos também a frequência de LT_{FH} nos subgrupos dos pacientes com complicações GI. A análise estatística demonstra que houve diferença significativa com maior frequência destas células em pacientes com padrão celíaco ($P=0,0001$), hipertensão portal ($P < 0,0001$), e diarreia crônica ($P= 0,0010$) em relação aos CTRL. O subgrupo NG não apresenta diferença significativa, porém mostra uma tendência a estarem com população de LT_{FH} aumentada em relação ao grupo CTRL (figura 46).

Figura 46: Porcentagem de LT_{FH} ($CD4^+CXCR5^+PD-1^+$) em CMSP nos diferentes subgrupos de pacientes ICV com complicação gastrointestinal em comparação a indivíduos CTRL. As barras representam as medianas dos valores e percentis 25 e 75. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's. Valores estatisticamente significantes foram representados por: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), $P < 0,0001$ (****). PC – padrão celíaco; HP – hipertensão portal; DC – diarreia crônica; NG – neoplasia gastrointestinal.

6.4. Correlação entre expressão de PD-L1 em LB e Linfócitos T foliculares ($CD4^+CXCR5^+$).

Analizamos a correlação entre PD-L1 nos LB a frequência de LT_{FH} nos pacientes com ICV e nos indivíduos controles. Observamos que não houve diferença significativa nos grupos estudados, sendo os valores de P e de coeficiente de correlação, os seguintes para cada grupo: CTRL ($p=0,36$ e $r=0,19$), ICV-GI ($p=0,074$ e $r=0,33$) e ICV-S/C ($p=0,84$ e $r=0,059$) figura 47.

Figura 47: Correlação da expressão de PD-L1 nos LB e frequência de LT_{FH} . A. Indivíduos do grupo controle; B. Pacientes com ICV do grupo GI; C. Pacientes com ICV do grupo S/C. Os valores de P foram calculados através do teste de comparação múltipla de Dunn's e os valores de r foram calculados através do teste de spearman. Valores estatisticamente significantes foram representados por: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (), $P < 0,001$ (***), $P < 0,0001$ (****).**

7. DISCUSSÃO

A ICV é considerada uma síndrome ou um conjunto de doenças, abrangendo provavelmente diversos distúrbios genéticos ainda pouco conhecidos. Apesar de ser o EII sintomático mais comum em adultos, o estabelecimento do diagnóstico é um desafio já que as manifestações clínicas são bastante variáveis, dificultando a suspeita clínica. A hipogamaglobulinemia é uma característica universal com redução/ausência da produção de anticorpos específicos, caracterizando perda de função de células B que ocorre possivelmente por defeitos na diferenciação dos LB em células plasmáticas^{52; 53}.

A fim de tornar o diagnóstico mais fácil e resolver este “guarda-chuva” de manifestações e distúrbios, os pesquisadores têm procurado subdividir os pacientes em subgrupos de acordo com suas características clínicas e/ou laboratoriais, observando as singularidades específicas de cada subgrupo.

Clinicamente, a ICV tem sido dividida em dois grandes grupos. Pacientes apenas com infecções sem nenhuma outra complicação e pacientes com complicações não infecciosas, principalmente autoimunes e/ou inflamatórias⁵⁴. No estudo de Chapel *et al.*, 2008, os pacientes foram separados por fenótipos clínicos e foi constatada uma menor taxa de mortalidade nos pacientes que manifestam apenas infecções de repetição. Por outro lado, manifestações gastrointestinais influenciam diretamente a morbidade e mortalidade da ICV, sendo as doenças inflamatórias e autoimunes do trato gastrointestinal a principal causa desta observação, e o risco de morte reportado foi 2,8 maior nestes pacientes do que naqueles sem complicações GI^{55; 56}.

Giardia, salmonela, *Campylobacter*, *Cryptosporidium*, citomegalovírus, *Helicobacter pylori* e, mais recentemente, norovírus são os principais agentes causadores de infecções gastrointestinais nos pacientes com ICV, levando à diarreia recorrente ou crônica. Já as enteropatias não infecciosas estão presentes em 20 a 60% dos pacientes com ICV, dependendo do estudo realizado, podendo se assemelhar histologicamente a outras condições gastrointestinais, como doença de Crohn, colites ulcerativas ou padrão celíaco⁵⁴.

As manifestações gastrointestinais, infecciosas ou não, estão presentes em aproximadamente 71% dos casos de ICV⁵⁷, e dentre elas, a diarreia é a mais relatada, estando

presente em 20 a 60% dos casos³¹. Ainda, do ponto de vista patogênico, existem 4 grupos principais relacionados as manifestações GI²⁸, são eles:

- Infecções (Giardíase, campilobacteriose, salmonelose, infecção por norovírus, supercrescimento bacteriano).
- Doenças inflamatórias (padrão celíaco, colite microscópica, colite ulcerativa, Doença de Crohn)
- Doenças malignas (neoplasia de estômago e intestino, linfoma)
- Doenças autoimunes (anemia perniciosa, hepatite autoimune, colangite biliar primária, acloridria)

Comparado a outras IDPs como Agamaglobulinemia ligada ao X e deficiência seletiva de IgA, as manifestações GI são mais frequentes nos pacientes com ICV, especialmente nos com deficiência de IgA, sugerindo que além da deficiência de anticorpos a cooperação entre linfócitos T e B também é de extrema importância para o desenvolvimento destas manifestações²⁸.

A ativação dos LB passa por duas etapas de sinalização, a primeira é quando o BCR reconhece o antígeno, e a segunda acontece pelos sinais dos co-receptores, que induzem sinais positivos ou negativos para sinalização das células⁴¹. Nossa hipótese foi que talvez uma expressão diferenciada dos marcadores PD-1 e PD-L1 nos linfócitos B de pacientes com ICV e em especial nos pacientes com ICV e manifestações GI, poderia sugerir um possível bloqueio durante o processo de maturação destes linfócitos. Thibult e col (2013), observaram que PD-1 foi fortemente expresso nas subpopulações de LB de indivíduos saudáveis, mas que essa expressão se desligava quando os LB entravam no GC para depois serem re-expressos quando saíssem, sendo esse processo desligamento das moléculas de PD-1 essencial para permitir a proliferação de LB e seleção de LB de memória. Esses resultados indicaram que PD-1 teria um papel importante para controlar a ativação de LB, porém não durante o processo de maturação de afinidade de BCR que geram os plasmócitos⁴¹. Para tanto, avaliamos a frequência de PD-1 e PD-L1 nos diferentes subtipos de linfócitos B em 29 pacientes com diagnóstico de ICV com manifestações gastrointestinais e comparamos com 14 pacientes com ICV sem complicações e 24 indivíduos saudáveis. Ainda, os pacientes com ICV e manifestações gastrointestinais foram subdivididos em padrão celíaco, hipertensão portal, diarreia crônica e neoplasia gástrica.

Dados demográficos do nosso estudo mostram média da idade de início dos sintomas na 2ª década de vida nos dois grupos de pacientes avaliados, entretanto, o diagnóstico foi feito, em média, na 3ª (só infecções) - 4ª década (ICV-GI). Chama a atenção o tempo decorrido entre o início dos sintomas e o diagnóstico, 14-16 anos, tempo longo e bastante acima do que tem sido descrito em outras coortes⁵⁴.

De acordo com a literatura, não há predileção por sexo em pacientes com ICV⁵⁸, entretanto, após a terceira década de vida há um ligeiro predomínio de pacientes do sexo feminino, já nos primeiros 10 anos de vida a maior prevalência é no sexo masculino⁷. Em nossa coorte, a média de idade dos pacientes pertencentes ao grupo ICV-GI foi de 43,6 anos, sem diferença entre os sexos, enquanto nos pacientes do grupo ICV sem complicações a média de idade foi mais baixa, mas sem diferença com ICV-GI. Na ICV-S/C, o sexo feminino foi prevalente, com 78,6% dos pacientes. Como estes pacientes foram selecionados de uma coorte de aproximadamente 200 pacientes, a diferença observada pode representar uma predileção do fenótipo clínico ‘apenas infecções’ pelo sexo feminino ou pode ser apenas ‘bias’. Não encontramos relatos na literatura sobre possível predileção pelo sexo feminino no grupo de pacientes com infecções apenas.

Dentre as manifestações clínicas, infecções de repetição, tanto do trato respiratório, como do trato gastrointestinal são as mais prevalentes nesses indivíduos, estando presentes em 98% de todos os pacientes^{54; 59; 60}. Em nossa coorte todos os nossos pacientes apresentaram infecções de repetição, sendo que, dentre os indivíduos do grupo ICV-GI as infecções mais presentes foram as pneumonias (96%), enquanto nos pacientes ICV-S/C a infecção mais prevalente foram as infecções respiratórias altas (92,8%).

Apesar das infecções respiratórias serem as infecções mais prevalentes nos EII, as infecções do TGI são mais difíceis de serem controladas, e podem levar à síndrome de má-absorção. Quadro potencialmente grave^{27; 28; 29}.

No nosso estudo foram selecionados para o grupo de ICV com manifestações gastrointestinais pacientes com diferentes tipos de doenças: com padrão celíaco (31%), hipertensão portal (37,9%), diarreia crônica não infecciosa (31%) e com neoplasia gástrica (13,8%). Dentre o grupo ICV-GI, 27,6% apresentavam diarreia infecciosa. A frequência das diferentes manifestações do TGI ainda não está muito bem definida, porém sabe-se que a diarreia é o sintoma mais frequente nos pacientes com ICV, enquanto as enteropatias não

infecciosas e que se assemelham a outras doenças e podem estar presentes de 10 a 12%^{30; 31; 32}.

Após caracterização clínica dos participantes do estudo, iniciamos a caracterização dos linfócitos B seguindo a ontogenia, isto é, LB transicional, LB naïve, LB de memória sem troca de isotipo, LB de memória com troca de isotipo e plasmablastos. Sabe-se que as células B são extremamente importantes para a resposta imune. São elas as principais responsáveis pela produção de anticorpos, além de possuir outras funções independentes de anticorpos, como, apresentação de antígenos, modulação da diferenciação e sobrevivência de linfócitos T, produção de citocinas inflamatórias e reguladoras, além de auxiliar na formação do tecido linfóide^{34; 61}.

Estudos com células B de camundongos foram os principais responsáveis por modular os esquemas de desenvolvimento de LB humanos, tendo sido identificados em humanos, frações equivalentes de células pro-B, pré-B, imatura, transicional e células B naïve na medula óssea de humanos. Sabe-se que células do sangue periférico podem reproduzir praticamente todos os LB encontrados nos tecidos linfóides, com possível exceção das células presentes no GC. Este conhecimento foi baseado em estudos realizados com células das tonsilas, do próprio sangue periférico e de análises mais limitadas do baço e linfonodos não malignos^{34; 61}.

A perda de função dos LB em pacientes com ICV é amplamente reportada^{7; 13; 54}. Ainda, observa-se ligeira redução quantitativa de LB nestes pacientes e cerca de 10% apresentam 1% ou menos de linfócitos B em sangue periférico³⁶. Ainda, redução das células B de memória com troca de isotipo e também de plasmoblastos é característica e faz parte dos critérios diagnósticos da ICV^{12; 62}. Diversos estudos demonstram diferenças importantes na distribuição das subpopulações de LB nos pacientes com ICV^{36; 37; 49; 50; 51; 63; 64; 65}.

Em nosso estudo, apenas o grupo de ICV com manifestações GI apresentou redução significativa de linfócitos B, sugerindo que este grupo possa ter características fenotípicas diferenciadas. Mesmo dentro deste grupo de pacientes, o subgrupo no qual a redução foi mais expressiva foi o de diarreia crônica e, embora em menor grau, os que apresentavam hipertensão portal também mostraram redução significativa de LB. Resnick et al., (2012), estudando uma coorte de pacientes norte-americanos, observaram que a redução de células B está associada a maior morbidade e mortalidade, por outro lado, Gathman et al., (2014) na coorte europeia, não confirmou esta associação.

Observamos um aumento expressivo de LB transitórios nos pacientes ICV em comparação a indivíduos saudáveis. Estes linfócitos B são recém saídos da medula óssea e considerados funcionalmente imaturos, são os precursores de LB naïve maduros e também de plasmócitos de vida curta. Wehr et al., (2008), quando descreveram a classificação EUROclass para ICV, já haviam relatado discreto aumento deste subtipo de linfócitos, mas, em 15% dos pacientes observaram aumento considerável e estava associado com número reduzido de LB de zona marginal³⁶. Depois, o aumento de LB transitórios nos pacientes ICV foi relacionado a um bloqueio no desenvolvimento dos LB transitórios T1 para LB transitórios T2 e este bloqueio está associado à deficiência de BAFF-R^{66; 67}. Ainda, observou-se que o aumento de LB transitórios poderia estar associado a linfadenopatia, característica observada com frequência em pacientes ICV com autoimunidade^{67; 68}. Neste contexto, o aumento destas células observado nos nossos pacientes com complicações GI pode estar relacionado à maior prevalência de doenças autoimunes neste grupo, e, além disso, 65% dos pacientes do grupo ICV-GI apresentavam algum tipo de linfoproliferação benigna. Reforçando esta hipótese, recentemente, Giltiay et al., (2019) em artigo de revisão, mostram que estas células têm algumas características marcantes como repertório de BCR distinto, alta expressão de AID (deaminase induzida por ativação), alta sensibilidade a PAMPs e habilidade para produzir citocinas. Ainda, apresentando evidências de que estes LB transitórios têm função na proteção contra infecções e podem ser uma fonte potencial de células produtoras de autoanticorpos em doenças autoimunes com lúpus eritematoso sistêmico⁶⁹.

Os linfócitos B naïve são os precursores dos LB de memória do centro germinativo e dos plasmócitos de vida curta e de vida longa; podem fazer respostas de anticorpo tardias e contínua, podem produzir anticorpos protetores de alta afinidade e autoanticorpos, produzem citocinas e fazem apresentação antigênica para LT⁶⁹. Constatamos um aumento deste subtipo de linfócitos em ambos os grupos de pacientes, porém o grupo de pacientes sem complicações apresentou uma tendência a ter uma frequência maior de LB naïve em relação aos pacientes com manifestações GI.

Vlkova et al., (2006) estudou os LB de pacientes ICV, dividindo-os segundo a classificação de Freiburg: Grupo I- pacientes com diminuição de LB de memória com troca de classe, sendo esse grupo subdividido entre I-a (pacientes com número elevado de células B imaturas) e I-b (pacientes com número normal de células B imaturas) ; grupo II (pacientes com LB de memória com troca de classe normais); e Grupo III (pacientes com menos de 1% de LB)⁴⁹. Eles observaram que os pacientes com diminuição dos LB de memória com troca

de classe apresentavam número elevado de LB naïve, enquanto os pacientes do grupo II apresentavam um comportamento similar aos controles, e do grupo III dados não foram suficientes. Ainda, em 2010 Vlkova et al., observou aumento de LB naïve também em pacientes com ICV que expressam níveis baixos ou normais de CD21⁵⁰.

Piqueras et al., em 2003, subdividiu seus pacientes com ICV em 3 grupos: pacientes com níveis normais de LB naïve e de memória, pacientes com redução de LB de memória com troca de classe porém com níveis normais de LB de memória sem troca de classe, e pacientes com redução de ambos os subtipos de LB de memória. Nos três grupos estudados não encontraram diferença significativa de LB naïve em comparação a indivíduos saudáveis⁷⁰. Ainda, no trabalho de Pedreschi et al., 2014 com coorte de pacientes do Hospital das Clínicas, foi observado um ligeiro aumento desta população em pacientes com ICV após vacinação contra *influenza*, entretanto, não constataram diferença na frequência de LB naïve em condições basais³⁷.

Em indivíduos saudáveis durante a fase de maturação do LB, as células B circulam pelos folículos, linfonodos e MO até passarem pelo processo de tolerância e sofrerem apoptose ou serem ativadas por antígeno. Durante este processo as células B completam sua maturação, se transformando em LB de memória e células plasmáticas, logo, no decorrer dos anos, os LB naïves vão diminuir nos indivíduos saudáveis, enquanto a frequência de LB de memória e células plasmáticas vão aumentando gradativamente^{33; 37; 71}. A ICV faz parte do grupo de deficiência de anticorpos, que corresponde de 50 a 70% de todas as IDPs. Defeitos precoces e tardios na diferenciação de LB em LB de memória e células plasmáticas são os principais responsáveis pela falha na síntese de anticorpos que caracteriza essa deficiência na ICV, portanto, talvez, por não conseguir realizar a diferenciação, pode haver um aumento da frequência de LB naïve^{7; 12; 50; 53; 64; 71}.

Em indivíduos saudáveis, os LB de memória sem troca de isotipo representam cerca de 25% do total de LB, sendo caracterizada pela expressão de IgM, IgD e CD27 na superfície. Já os LB de memória com troca de classe, representam 40% do total de LB em adultos, porém, expressam CD27, um marcador de memória, mas deixam de expressar IgM e IgD³⁷. Na ICV, os LB de memória sem troca de classe podem estar diminuídos ou não^{37; 64; 72}. Nosso estudo mostra redução dos LB de memória sem troca de isotipo nos dois grupos de pacientes estudados, mas com maior significância no grupo de pacientes com infecções apenas. Ainda, é necessário comentar que, como tivemos problemas com a marcação de IgM na superfície, o

que estamos denominando de LB sem troca de isotipo, possivelmente engloba este tipo celular e também os LB de zona marginal que se caracterizam pela expressão de IgM⁺, IgD⁺ e CD27 (18).

Por outro lado, a redução de LB de memória com troca de classe nos indivíduos com ICV é tão característico que faz parte dos critérios diagnósticos da ICV. A redução destas células indica distúrbio na função do centro germinativo (Wehr et al, 2008). Porém, na análise destes linfócitos com troca de isotipo, os pacientes com manifestações gastrointestinais apresentam diminuição significativa, enquanto os pacientes sem complicações demonstram apenas uma tendência à redução. Aqui também é importante salientar que problemas com a marcação de IgM altera a composição celular, pois além dos LB de memória IgG, IgA e IgE positivos, temos a população IgM⁺ (LB de memória pré-troca) (18).

Por fim, avaliamos os plasmoblastos. Dados da literatura apontam para uma redução drástica desta população na ICV^{73; 74} e nossos resultados estão de acordo com a literatura, demonstrando uma quantidade praticamente nula desta subpopulação no sangue periférico. Wehr et al.(2008) associaram a diminuição de PBL ao aumento da incidência de doenças autoimunes em pacientes com ICV³⁶. Em nosso estudo, a produção de PBL foi similar entre todos os pacientes independente de suas comorbidades. Pedreschi et al., em 2014 com coorte de pacientes também do nosso serviço verificou quantidade muito próxima a zero de plasmoblastos antes destes pacientes serem vacinados com vírus influenza. Após a vacinação, Pedreschi et al(2014)., observou um aumento significativo da frequência dessas células tanto em condições basal como em condições de cultivo de células com lisado viral e com peptídeo HA, contudo, após o terceiro mês da administração das vacinas, observou-se uma redução gradativa da frequência dessas células quando cultivadas com lisado viral e peptídeo HA³⁷.

Abaixo apresentamos a tabela com um resumo dos nossos resultados comparando ao que é descrito na literatura (Tabela 11).

Tabela 11

	Nossos achados		Literatura	Referências
	ICV GI	ICV S/C	ICV	
LB Transicional	↑	↑	Normal / ↑	36; 37; 47; 48

LB Naïve	↑	↑	Normal / ↑	36; 37; 47; 48; 49; 50
LB memória S/T	↓	↓	Normal/ ↓	36; 37; 47; 48
LB memória C/T	↓	Normal	↓	36; 37; 47; 48; 51
Plasmoblasto	↓	↓	↓	36; 37; 47; 48

Seguiremos a discussão avaliando a expressão de PD-1/PD-L1 em células B com o intuito de melhor compreender do seu papel nestes linfócitos.

A via PD-1/PD-L1 é de suma importância na resposta imune, mostrando-se crítica para as vias de sinalização inibitórias que regulam resposta de LT e mantém a tolerância periférica através da modulação da atividade de LT, ativação de apoptose de LT antígeno-específicos e inibindo a apoptose de Treg^{44; 75}. Esta via vem sendo muito estudada principalmente na resposta antitumoral, e a inibição de PD-1 promove uma efetiva resposta contra células cancerígenas, com uma taxa de resposta que varia de 4 a 87% em neoplasias hematológicas e 11,2 a 61 % em tumores sólidos⁴⁵.

Riella et al.,2012, analisaram minuciosamente as principais funções da via PD-1/PD-L1. Sabe-se que essa via tem um papel importante na resposta imune das células T, sendo sua principal função a inibição de linfócitos T através da ligação de PD-1 em LT e PD-L1 em APCs, sendo relatado em estudos com bloqueio desta via a melhora na capacidade das APCs de estimularem os LT. Essa via também afeta diretamente a proliferação dos LT e a produção de citocinas como IFN- γ , TNF- α , e IL-2⁷⁶.

O papel de PD-1 em LB não está bem esclarecido, entretanto, sabe-se que PD-1 gera um sinal inibitório quando se liga aos seus ligantes tanto no receptor de célula T (TCR) como no receptor de célula B (BCR), logo, pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento dos LB, estando diretamente relacionado a produção de anticorpos nos LB ou indiretamente através de efeitos secundários devido ligação aos LT ⁷⁶. Ainda, em 2010, utilizando camundongos *Knockout* PD-1^{-/-}, Good-Jacobson et al., descreveram que a ausência de PD-1 pode levar a diminuição de células plasmáticas de vida longa³⁸.

Em 2013, Thibult et al. quantificaram os transcritos de PD-1 em células B periféricas não ativadas, comparando a expressão desta molécula nos subtipos de LB de indivíduos saudáveis em CMSP e linfonodos. Eles observam a expressão de PD-1 em CMSP,

identificando que este era expresso em LB naïve, e expresso de forma distinta nos linfócitos B de memória IgM⁺ e linfócitos B de memória comutados, entretanto, em células B do centro germinativo observou-se que PD-1 perde seu sinal, como se, de certa forma esta molécula fosse “desligada” e “ligada” outra vez quando os LB saem do GC e completam sua maturação. Assim como Thibult et al, observamos expressão de PD-1 em LB naïve, em pacientes com ICV e controles. Infelizmente, devido a problemas técnicos, não pudemos avaliar as células B de memória IgM⁺.

No mesmo artigo, Thibult et al., descreveram que os LB de memória sem troca de classe expressavam mais PD-1 em comparação à expressão em LB naïve e LB de memória com troca de classe⁴¹. Em nosso trabalho, não observamos diferença de expressão de PD-1 entre LB de memória S/T e LB naïve, porém, a expressão de PD-1 em LB de memória com troca de classe mostrou apenas uma tendência a redução quando comparada aos LB naïve e LB memória S/T nos pacientes com ICV-GI e ICV-S/C, porém, no grupo CTRL essa redução foi significativa.

Quando comparamos a expressão de PD-1 nas subpopulações de LB nos diferentes grupos do nosso estudo, observamos um comportamento muito similar entre eles. Entretanto, quando avaliamos a expressão de PD-1 nos LB transicionais, foi possível observar maior expressão de PD-1 nos grupos de pacientes com ICV quando comparados ao grupo controle. Ainda, constatamos apenas uma tendência dos pacientes ICV-GI expressarem menos PD-1 em células transicionais do que os pacientes ICV sem complicações.

Outro dado interessante encontrado em nosso trabalho foi a expressão de PD-1 em LB de memória sem troca de classe. Observamos que pacientes ICV-GI expressavam menos PD-1 em relação aos pacientes ICV-S/C, e, que os CTRL têm uma tendência a expressar menos PD-1 também em comparação aos pacientes sem complicações.

As diferenças na expressão de PD-1 puderam ser bem observadas no gráfico de expressão de PD-1 na ontogenia de célula B (figura 41). Interessantemente, pudemos observar que PD-1 foi bem expressivo nas fases de LB transicionais, LB naïve e LB de memória sem troca de isotipo, enquanto quando os LB se transformaram em LB de memória com troca de classe e plasmoblastos a expressão de PD-1 diminuiu drasticamente, sugerindo, apesar de não ter sido avaliado a expressão de PD-1 no GC, que PD-1 realmente pode sofrer um “switch off”. Entretanto, uma das nossas hipóteses era que a expressão PD-1 pudesse estar elevada nessas fases, o que contribuiria para a hipogamaglobulinemia nos pacientes com ICV, o que

não ocorreu em nosso estudo. Contudo, entendemos que a expressão de PD-1 em LB transicionais nos pacientes com ICV-GI e ICV-S/T, e a expressão de PD-1 em LB de memória S/T nos pacientes ICV-S/C são alguns achados interessantes e que necessita, de mais estudos.

Apesar do foco principal do nosso trabalho estar diretamente ligado à expressão de PD-1, também avaliamos a expressão de PD-L1 em nossos grupos de estudo, e Até o presente momento não temos conhecimento de nenhum outro estudo que tenha verificado a expressão de PD-L1 em LB de pacientes com ICV.

Em nossos achados não verificamos diferenças significativas da expressão dessa molécula nos subtipos de LB, porém, interessante, encontramos diferença estatística quando avaliamos a expressão dessa célula em LB totais, verificando que os pacientes do grupo ICV-GI expressaram bem menos PD-L1 do que os grupos CTRL e ICV-S/C. Zacca et al., em 2018 avaliaram a frequência de PD-L1 em LB de indivíduos saudáveis e pacientes com artrite reumatoide (AR), eles verificaram que PD-L1 é expresso em LB, dados que corroboram nosso estudo, e também verificaram que os pacientes com AR expressavam menos PD-L1 do que indivíduos saudáveis⁷⁷. Como o perfil dos nossos pacientes com ICV-GI exibe doenças autoimunes e os pacientes ICV-S/C apresentaram níveis similares de PD-L1 ao grupo CTRL, pode ser sugestivo que os níveis de PD-L1 estejam relacionados às doenças autoimunes, entretanto, mais estudos são necessários para confirmar essa observação.

Sabemos que as células T_{FH} são fundamentais na indução da diferenciação para plasmócitos e células B de memória⁷⁸. Os erros inatos da imunidade tem ajudado a esclarecer as necessidades para o desenvolvimento da resposta imune normal, incluindo a geração de células T_{FH} e centro germinativo. As células T_{FH} expressam altos níveis de PD-1, e PD-L1 e PD-L2 estão aumentados nas células B do centro germinativo⁴⁴. PD-1 tem se mostrado importante na regulação da resposta B no centro germinativo. Kawamoto et al. Demonstraram que a deficiência de PD-1 leva a um aumento do número de LT_{FH} com fenótipo anormal determinando uma seleção desregulada de LB e diversidade de anticorpos no GC⁷⁹.

Os estudos com PD-1 em LB são raros, e até o momento não encontramos nenhum artigo sobre a expressão desta molécula em imunodeficiências, especialmente na ICV, contudo, existem alguns estudos importantes com a via PD-1/PD-L1 em LT de pacientes com ICV já descritos na literatura, como o de Coraglia et al, que em 2016 avaliou os LT_{FH} de

pacientes com ICV, onde uma das formas de avaliar fenotipicamente essas células é através da marcação com CXCR5 e PD-1⁴⁰.

No estudo de Coraglia et al. (2016), foram avaliados dois grupos de pacientes com ICV em comparação com indivíduos saudáveis. O primeiro grupo era formado por pacientes com doenças granulomatosa e/ou autoimune, enquanto o segundo grupo era formado por pacientes sem estas complicações. Em ambos os grupos foi demonstrado que a frequência de LT_{FH} era maior nos pacientes com ICV do que em indivíduos saudáveis, sendo que no grupo com doenças autoimunes e doença granulomatosa esta diferença era ainda mais evidente⁴⁰.

Em nosso estudo também avaliamos os LT_{FH}, marcando com CXCR5 e PD-1. Também observamos que os pacientes com ICV tem uma frequência maior de LT_{FH} em comparação com indivíduos saudáveis, corroborando com os achados de Coraglia et al.. Outro achado interessante foi que os pacientes ICV com manifestações gastrointestinais apresentam maior frequência de LT_{FH} quando comparados aos pacientes ICV sem complicações. Ainda, avaliando os subgrupos de pacientes com manifestações GI, verificamos que os pacientes com padrão celíaco, hipertensão portal, e diarreia crônica apresentam maior frequência destas células em relação aos controles, enquanto o subgrupo de neoplasias demonstrou apenas tendência a ter uma frequência maior de LT_{FH} comparada aos CTRL.

Coraglia et al (2016) entendem em seu estudo que defeitos intrínsecos de LT_{FH} funcionais não são a principal causa de ICV, entretanto, podem desempenhar um papel importante⁴⁰ e nós compartilhamos desta opinião.

Cubas et al, em 2013, avaliou a via PD-1/PD-L1 em LT_{FH} de pacientes com HIV, demonstrando que PD-1 nestes pacientes se encontrava com frequência elevada em relação a indivíduos saudáveis, inibindo a proliferação e atividade celular, regulando negativamente a secreção de IL-4 e IL-21 e inibindo as funções de ICOS⁸⁰. Neste estudo de Cubas et al. foi realizada então a cocultura de LT_{FH} com LB, e efetuado o bloqueio da via PD-1/PD-L1, além de se testar o efeito da suplementação com IL-21. Em ambas as situações houve melhora na produção de células plasmáticas e anticorpos⁸⁰.

A IL-21 faz parte da família de citocinas de cadeia gama comum (γ c), composta também por IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, e IL-15^{81; 82}. Essa citocina é expressa por diferentes tipos celulares como LT CD4⁺, incluindo LT_{FH} e células NKT, enquanto seu receptor IL-21R pode

ser expresso por LT, LB, células NK, células dendríticas e macrófagos, além de poder ser expresso também por células não imunes, como células epiteliais e queratinócitos⁸²

Dentro dos LB, é sabido que LB naïve, de memória, do GC e células plasmáticas podem expressar IL-21R. Ainda, IL-21 é responsável por controlar a ativação, proliferação, diferenciação, citotoxicidade e sobrevivência de diversas células imunes, sendo muito importante para geração de resposta de LB no GC, resultando, através da interação dos LB com LT_{FH} na produção de anticorpos, troca de classe de imunoglobulinas, afinidade de maturação e desenvolvimento dos LB⁸³.

Em 2009, Borte et al., descreveram que a suplementação de IL-21 em pacientes com ICV e deficiência seletiva de IgA restaura a produção de imunoglobulinas⁸⁴, e em 2018, Desjardins et al⁸⁵., demonstraram que a modulação de IL-21 em pacientes com ICV exibe dois grupos possíveis, indivíduos respondedores de IL-21 e não respondedores, onde os indivíduos que respondiam à IL-21 voltavam a produzir imunoglobulinas e a aumentavam a frequência de plasmoblastos, enquanto os não respondedores consequentemente não restauravam a produção destas imunoglobulinas e plasmoblastos. Um dado interessante observado por Desjardins et al., foi que o grupo de pacientes não respondedores apresentavam mais complicações como doenças autoimunes, citopenias e esplenomegalias, e apenas os pacientes não respondedores tinham sintomas como diarreia e enteropatias.

Como podemos ver, estudos com suplementação de IL-21 já foram e estão sendo realizados em pacientes com ICV. Cubas et al (2013) demonstraram em pacientes com HIV que além de IL-21 a via PD-1/PD-L1 demonstra ser uma via muito interessante a ser estudada em pacientes com alguma causa de hipogamaglobulinemia⁸⁰. Thibult et al (2013) avaliou também que após estímulo dos LB com TLR9, estimulando a produção de PD-L1, o bloqueio da via PD-1/PD-L1 de fato leva a um aumento da ativação, proliferação e produção de citocinas inflamatórias, mostrando que essa via tem um papel inibitório muito importante nos LB e destacando o potencial terapêutico dessas moléculas para modular a ativação de LT e B.

Concluindo, entendemos que a realização de estudos visando o bloqueio da via PD-1/PD-L1 é muito importante no futuro, porém, infelizmente, não foi possível fazer. Por fim, entendemos que PD-1 e PD-L1 são moléculas que podem ter um papel importante na ICV, apesar de não serem a causa da doença.

8. CONCLUSÕES

- Pacientes com ICV expressam PD-1.
- A avaliação da expressão de PD-1 nos diferentes subtipos de linfócitos B mostrou um aumento significativo em LB transicionais.
- Apesar do teste de correlação não demonstrar diferença significativa entre PD-L1 em LB e frequência de LT_{FH} , nós observamos aumento da frequência de células T_{FH} nos pacientes com ICV de ambos os grupos e diminuição da expressão de PD-L1 em LB dos pacientes com ICV do grupo GI, portanto trata-se de um dado importante que deve continuar sendo estudado, principalmente em grupos maiores de pacientes com ICV.
- Pacientes com ICV e complicações gastrointestinais apresentaram número menor de linfócitos B comparados aos controles, com redução nos subgrupos diarreia crônica e hipertensão portal.
- As diferenças significativas apresentadas entre pacientes com ICV com complicações GI e sem complicações neste estudo, como, redução do número de LB totais e de PD-1 em LB totais apenas nos pacientes ICV-GI em comparação ao grupo CTRL, além da expressão reduzida de PD-L1 em LB totais nos pacientes ICV-GI em comparação ao grupo CTRL e ICV-S/C, redução da expressão de PD-1 em LB de memória sem troca de classe em pacientes ICV-GI em comparação aos pacientes ICV-S/C, além da tendência dos pacientes ICV-GI terem frequência reduzida de LB naïve e aumentada de LT_{FH} em comparação aos pacientes ICV-S/C, reforçam o conceito de que os pacientes ICV com complicações apresentam uma desregulação imunológica mais importante que justificaria a evolução clínica mais grave e aumento de mortalidade já descrita na literatura.

9. ANEXOS

Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº: APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL:

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.):

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº: APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: “Avaliação da expressão e função de PD-1 e seu ligante PD-L1 nas subpopulações de Linfócitos B em pacientes com Imunodeficiência Comum Variável (ICV).”

PESQUISADOR : Dra. Cristina Maria Kokron

CARGO/FUNÇÃO: Médica Assistente

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 49888

UNIDADE DO HCFMUSP: Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒

RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐

RISCO MAIOR ☐

3. DURAÇÃO DA PESQUISA : 3 ANOS

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – HC-FMUSP

1 – Desenho do estudo e objetivo(s): O senhor (a) tem uma doença na qual não existe produção de algumas substâncias que normalmente protegem as pessoas das infecções. Estas substâncias são chamadas anticorpos ou imunoglobulinas. No caso da sua doença, a Imunodeficiência Comum Variável, o seu organismo, por um motivo que nós ainda desconhecemos, deixou de produzir estas imunoglobulinas. Por causa disto, o senhor (a) começou a apresentar várias infecções, e, para proteger-se destas infecções é necessário repor estes anticorpos, que fazemos administrando imunoglobulinas, por via venosa, uma vez por mês. Este tratamento é feito gratuitamente no Hospital das Clínicas. mas para estudarmos melhor a causa desta doença e eventualmente descobriremos um tratamento mais específico e eficiente, gostaríamos de avaliar a expressão das moléculas PD-1 e seu ligante PD-L1 nas subpopulações de linfócitos B presente no seu sangue. Para esta avaliação serão necessárias coletas de 4 amostras de sangue, uma antes do senhor tomar imunoglobulina intravenosa, a segunda de 3 meses após, a terceira após 6 meses e a quarta 1 ano após do início do seu tratamento para realizarmos algumas análises científicas. Essas coletas de sangue periférico não apresentam nenhum risco. Em consequência da sua doença, não sabemos se essas moléculas interferem no seu tratamento e é exatamente isto que queremos estudar.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros: Será realizada a coleta de 40 mL de sangue (4 colheres de sopa), para realização dos exames de laboratório para avaliação da expressão das moléculas PD-1 e seu ligante PD-L1 nas subpopulações de linfócitos B e outros parâmetros importantes para correlacioná-las.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados: Coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3: Os desconfortos da coleta de sangue podem ser dor local e formação de pequenas manchas roxas (hematomas) no local da coleta. Os riscos são mínimos e iguais aos de qualquer outra coleta de sangue para exames de rotina.

5 – Benefícios para o participante: Você não receberá qualquer a curto-prazo participando deste estudo. As informações obtidas a partir desta pesquisa poderão beneficiar outras pessoas, inclusive você mesmo no futuro, pois entendendo melhor a doença e seus

mecanismos, podemos tentar encontrar um tratamento mais eficiente para reduzir o número de infecções.

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: NÃO HÁ.

7 – Garantia de acesso:

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. As principais investigadoras são a *Dra. Cristina Kokron* e a aluna de doutorado *Bianca Almeida Natali dos Santos*, que podem ser encontradas no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155 – 8º andar – Bloco 8A, São Paulo-SP, Prédio dos Ambulatórios, secretaria de Imunologia e Alergia Telefone (s) 2661-6098 ou 2661-6225, e-mail: imunodisciplina.ichc@hc.fm.usp.br.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – CEP 05403010 São Paulo-SP. Tel: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br.

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

9 – Direito de confidencialidade: As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 – Despesas e compensações: Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **“Avaliação da expressão e função de PD-1 e seu ligante PD-L1 nas subpopulações de Linfócitos B em pacientes com Imunodeficiência Comum Variável (ICV).”**

Eu discuti com a ***Dra. Cristina Kokron*** e a aluna ***Bianca Almeida Natali dos Santos*** sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha _____ Data ____ / ____ / ____

(Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual).

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

Anexo 2 – Parecer Consubstanciado do CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da expressão e função de PD-1 e seu ligante PD-L1 nas subpopulações de linfócitos B em pacientes com Imunodeficiência Comum Variável (ICV)

Pesquisador: Cristina Maria Kokron

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 58699416.2.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.752.240

Apresentação do Projeto:

Estudo prospectivo, composto por 40 pacientes de ambos os sexos com Imunodeficiência Comum Variável (Ambulatório de Imunodeficiências Primárias do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do HC-FMUSP) e 20 voluntários saudáveis pareados por idade sem histórico da doença, entre 18 a 60 anos. Em 10 pacientes serão realizadas coletas seriadas em quatro intervalos de tempo: 1) no momento do diagnóstico, antes da administração de imunoglobulina e após 2) três meses, 3) seis meses e 4) um ano do início do tratamento com imunoglobulina intravenosa. Serão coletados 40 mL de sangue periférico por punção venosa.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a expressão de PD-1 e PD-L1 nas subpopulações de linfócitos B em pacientes com Imunodeficiência Comum Variável e sua correlação com as diferentes manifestações clínicas e imunológicas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há benefícios diretos aos participantes. Riscos apenas relacionados à punção venosa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Será testada a hipótese de que a expressão diferenciada de PD-1 e PD-L1 nos linfócitos B dos

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappelq.adm@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 1.752.240

pacientes com Imunodeficiência Comum Variável interfere na diferenciação e função das subpopulações de linfócitos inclusive dos plasmoblastos destes indivíduos

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Favor utilizar o formulário atualizado de TCLE constante no site CAPPesq.

Retirar a frase: "Essas coletas de sangue periférico não apresentam nenhum risco". Deixar apenas a frase do item 4 (Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3).

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Favor observar recomendação acima no item de considerações sobre TCLE.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_737082.pdf	12/08/2016 10:56:02		Aceito
Outros	Cadastro_de_Pesquisa_On_Line.PDF	12/08/2016 10:54:43	Bianca Almeida Natali dos Santos	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_Assinada.PDF	12/08/2016 10:52:38	Bianca Almeida Natali dos Santos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEv2.docx	21/07/2016 13:59:00	Bianca Almeida Natali dos Santos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	14/06/2016 15:12:15	Bianca Almeida Natali dos Santos	Aceito

Situação do Parecer:

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 1.752.240

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 29 de Setembro de 2016

Assinado por:

ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Página 03 de 03

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ OURICURI, G. **Imunodeficiências Primárias: Quando suspeitar.**In: **Diagnóstico e Tratamento das Doenças Imunológicas.** Elsevier pg 237-240 2005.
- ² AKKAYA, M.; KWAK, K.; PIERCE, S. K. B cell memory: building two walls of protection against pathogens. **Nat Rev Immunol**, v. 20, n. 4, p. 229-238, 04 2020. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31836872> >.
- ³ NEMAZEE, D. Mechanisms of central tolerance for B cells. **Nat Rev Immunol**, v. 17, n. 5, p. 281-294, May 2017. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28368006> >.
- ⁴ GORCZYNSKI,R. **Imunologia Clínica:** Reichman e Afonso Editora, 2001.
- ⁵ MUELLER BU, P. P. **Medical progress: cancer in children with primary and secondary immunodeficiencies:** J Pediatr. 126: 1-10 p. 1995.
- ⁶ BOUSFIHA, A. et al. Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update of the IUIS Phenotypical Classification. **J Clin Immunol**, v. 40, n. 1, p. 66-81, 01 2020. ISSN 1573-2592. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32048120> >.
- ⁷ BONILLA, F. A. et al. International Consensus Document (ICON): Common Variable Immunodeficiency Disorders. **J Allergy Clin Immunol Pract**, v. 4, n. 1, p. 38-59, 2016 Jan-Feb 2016. ISSN 2213-2201. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26563668> >.
- ⁸ ABBOTT, J. K.; GELFAND, E. W. Common Variable Immunodeficiency: Diagnosis, Management, and Treatment. **Immunol Allergy Clin North Am**, v. 35, n. 4, p. 637-58, Nov 2015. ISSN 1557-8607. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26454311> >.

- ⁹ GATHMANN, B. et al. Clinical picture and treatment of 2212 patients with common variable immunodeficiency. **J Allergy Clin Immunol**, v. 134, n. 1, p. 116-26, Jul 2014. ISSN 1097-6825. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24582312> >.
- ¹⁰ GRIMBACHER, B.; PARTY, E. R. W. The European Society for Immunodeficiencies (ESID) registry 2014. **Clin Exp Immunol**, v. 178 Suppl 1, p. 18-20, Dec 2014. ISSN 1365-2249. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25546747> >.
- ¹¹ CONLEY, M. E.; NOTARANGELO, L. D.; ETZIONI, A. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies). **Clin Immunol**, v. 93, n. 3, p. 190-7, Dec 1999. ISSN 1521-6616. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10600329> >.
- ¹² ESID Registry – Working Definitions for Clinical Diagnosis of PID. <https://esid.org/Working-Parties/Registry/Diagnosis-criteria>, 2014.
- ¹³ ROMBERG, N.; LAWRENCE, M. G. Birds of a feather: Common variable immune deficiencies. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 123, n. 5, p. 461-467, 11 2019. ISSN 1534-4436. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31382019> >.
- ¹⁴ ABOLHASSANI, H.; HAMMARSTRÖM, L.; CUNNINGHAM-RUNDLES, C. Current genetic landscape in common variable immune deficiency. **Blood**, v. 135, n. 9, p. 656-667, Feb 2020. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31942606> >.
- ¹⁵ LI, R. et al. Common Variable Immunodeficiency with Genetic Defects Identified by Whole Exome Sequencing. **Biomed Res Int**, v. 2018, p. 3724630, 2018. ISSN 2314-6141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30363934> >.
- ¹⁶ SALZER, U.; WARNATZ, K.; PETER, H. H. Common variable immunodeficiency: an update. **Arthritis Res Ther**, v. 14, n. 5, p. 223, 2012. ISSN 1478-6362. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23043756> >.

- ¹⁷ JØRGENSEN, S. F.; FEVANG, B.; AUKRUST, P. Autoimmunity and Inflammation in CVID: a Possible Crosstalk between Immune Activation, Gut Microbiota, and Epigenetic Modifications. **J Clin Immunol**, Nov 2018. ISSN 1573-2592. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30465180> >.
- ¹⁸ AGGARWAL, V. et al. Recent advances in elucidating the genetics of common variable immunodeficiency. **Genes Dis**, v. 7, n. 1, p. 26-37, Mar 2020. ISSN 2352-3042. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32181273> >.
- ¹⁹ POODT, A. E. et al. TACI mutations and disease susceptibility in patients with common variable immunodeficiency. **Clin Exp Immunol**, v. 156, n. 1, p. 35-9, Apr 2009. ISSN 1365-2249. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19210517> >.
- ²⁰ GEREIGE, J. D.; MAGLIONE, P. J. Current Understanding and Recent Developments in Common Variable Immunodeficiency Associated Autoimmunity. **Front Immunol**, v. 10, p. 2753, 2019. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31921101> >.
- ²¹ YAZDANI, R. et al. Evaluation of Known Defective Signaling-Associated Molecules in Patients Who Primarily Diagnosed as Common Variable Immunodeficiency. **Int Rev Immunol**, v. 35, n. 1, p. 7-24, 2016. ISSN 1563-5244. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26959802> >.
- ²² BOGAERT, D. J. et al. Genes associated with common variable immunodeficiency: one diagnosis to rule them all? **J Med Genet**, v. 53, n. 9, p. 575-90, Sep 2016. ISSN 1468-6244. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27250108> >.
- ²³ PICARD, C. et al. International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. **J Clin Immunol**,

- v. 38, n. 1, p. 96-128, 01 2018. ISSN 1573-2592. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29226302> >.
- ²⁴ CHAPEL, H. et al. Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. **Blood**, v. 112, n. 2, p. 277-86, Jul 2008. ISSN 1528-0020. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18319398 >.
- ²⁵ S., J. The variable in common variable immunodeficiency: a disease of complex phenotypes. **J Allergy Clin Immunol Pract**, v. 1, n. 6, p. 545-56, 2013.
- ²⁶ AGARWAL, S.; MAYER, L. Diagnosis and treatment of gastrointestinal disorders in patients with primary immunodeficiency. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 11, n. 9, p. 1050-63, Sep 2013. ISSN 1542-7714. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23501398> >.
- ²⁷ AL-MUHSEN, S. Z. Gastrointestinal and Hepatic Manifestations of Primary Immune Deficiency Diseases. In: (Ed.). **Saudi J Gastroenterol**, v.16, 2010. p.66-74. ISBN 1319-3767 (Print)1998-4049 (Electronic).
- ²⁸ PECORARO, A. et al. Chronic Diarrhea in Common Variable Immunodeficiency: a Case Series and Review of the Literature. **J Clin Immunol**, v. 38, n. 1, p. 67-76, Jan 2018. ISSN 0271-9142. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10875-017-0461-z> >.
- ²⁹ ATALAIA-MARTINS, C. et al. Common Variable Immunodeficiency with Several Gastrointestinal Manifestations. In: (Ed.). **ACG Case Rep J**, v.4, 2017. ISBN 2326-3253 (Electronic).
- ³⁰ AGARWAL, S. et al. Characterization of immunologic defects in patients with common variable immunodeficiency (CVID) with intestinal disease. **Inflamm Bowel Dis**, v. 17, n. 1, p. 251-9, Jan 2011. ISSN 1536-4844. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20629103> >.

- ³¹ JØRGENSEN, S. F. et al. A Cross-Sectional Study of the Prevalence of Gastrointestinal Symptoms and Pathology in Patients With Common Variable Immunodeficiency. **Am J Gastroenterol**, v. 111, n. 10, p. 1467-1475, Oct 2016. ISSN 1572-0241. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27527747> >.
- ³² UZZAN, M. et al. Gastrointestinal Disorders Associated with Common Variable Immune Deficiency (CVID) and Chronic Granulomatous Disease (CGD). **Curr Gastroenterol Rep**, v. 18, n. 4, p. 17, Apr 2016. ISSN 1534-312X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26951230> >.
- ³³ ABBAS AK, L. A., PILLAI S. **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: 2015.
- ³⁴ SANZ, I. et al. Challenges and Opportunities for Consistent Classification of Human B Cell and Plasma Cell Populations. **Front Immunol**, v. 10, p. 2458, 2019. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31681331> >.
- ³⁵ CUNILL, V. et al. Follicular T Cells from smB(-) Common Variable Immunodeficiency Patients Are Skewed Toward a Th1 Phenotype. **Front Immunol**, v. 8, p. 174, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28289412> >.
- ³⁶ WEHR, C. et al. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. **Blood**, v. 111, n. 1, p. 77-85, Jan 2008. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17898316> >.
- ³⁷ PEDRESCHI, M.; KOKRON, C. M. **Avaliação do perfil dos linfócitos B de pacientes com Imunodeficiência Comum Variável antes e após administração de antígenos protéicos e polissacarídicos**. São Paulo (SP): Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo 2014.

- 38 GOOD-JACOBSON, K. L. et al. PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. **Nat Immunol**, v. 11, n. 6, p. 535-42, Jun 2010. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20453843> >.
- 39 HAMS, E. et al. Blockade of B7-H1 (programmed death ligand 1) enhances humoral immunity by positively regulating the generation of T follicular helper cells. **J Immunol**, v. 186, n. 10, p. 5648-55, May 2011. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21490158> >.
- 40 CORAGLIA, A. et al. Common Variable Immunodeficiency and Circulating TFH. **J Immunol Res**, v. 2016, p. 4951587, 2016. ISSN 2314-7156. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27069935> >.
- 41 THIBULT, M. L. et al. PD-1 is a novel regulator of human B-cell activation. **Int Immunol**, v. 25, n. 2, p. 129-37, Feb 2013. ISSN 1460-2377. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23087177> >.
- 42 KEIR, M. E. et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. **Annu Rev Immunol**, v. 26, p. 677-704, 2008. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18173375> >.
- 43 OKAZAKI, T.; HONJO, T. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. **Trends Immunol**, v. 27, n. 4, p. 195-201, Apr 2006. ISSN 1471-4906. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16500147> >.
- 44 ZHONG, X. et al. PD-L2 expression extends beyond dendritic cells/macrophages to B1 cells enriched for V(H)11/V(H)12 and phosphatidylcholine binding. **Eur J Immunol**, v. 37, n. 9, p. 2405-10, Sep 2007. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17683117> >.

- 45 SUN, X. et al. Immunosuppressive B cells expressing PD-1/PD-L1 in solid tumors: A mini review. **QJM**, Jun 2019. ISSN 1460-2393. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31250021> >.
- 46 ROEDERER, M. Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats. **Cytometry**, v. 45, n. 3, p. 194-205, Nov 2001. ISSN 0196-4763. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11746088> >.
- 47 MORBACH, H. et al. Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. **Clin Exp Immunol**, v. 162, n. 2, p. 271-9, Nov 2010. ISSN 1365-2249. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20854328> >.
- 48 MOUILLOT, G. et al. B-cell and T-cell phenotypes in COVID patients correlate with the clinical phenotype of the disease. **J Clin Immunol**, v. 30, n. 5, p. 746-55, Sep 2010. ISSN 0271-9142. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10875-010-9424-3> >.
- 49 VLKOVÁ, M. et al. Age dependency and mutual relations in T and B lymphocyte abnormalities in common variable immunodeficiency patients. **Clin Exp Immunol**, v. 143, n. 2, p. 373-9, Feb 2006. ISSN 0009-9104. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16412063> >.
- 50 VLKOVA, M. et al. Characterization of lymphocyte subsets in patients with common variable immunodeficiency reveals subsets of naive human B cells marked by CD24 expression. **J Immunol**, v. 185, n. 11, p. 6431-8, Dec 1 2010. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0903876> >.
- 51 BRIGHT, P. et al. Changes in B cell immunophenotype in common variable immunodeficiency: cause or effect - is bronchiectasis indicative of undiagnosed immunodeficiency? **Clin Exp Immunol**, v. 171, n. 2, p. 195-200, Feb 2013. ISSN 1365-2249. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23286946> >.

- 52 PECORARO, A. et al. Heterogeneity of Liver Disease in Common Variable Immunodeficiency Disorders. **Front Immunol**, v. 11, p. 338, 2020. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32184784> >.
- 53 SANCHEZ-RAMON, S. et al. Memory B cells in common variable immunodeficiency: clinical associations and sex differences. **Clin Immunol**, v. 128, n. 3, p. 314-21, Sep 2008. ISSN 1521-6616. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2008.02.013> >.
- 54 CUNNINGHAM-RUNDLES, C. Common variable immune deficiency: Dissection of the variable. **Immunol Rev**, v. 287, n. 1, p. 145-161, 01 2019. ISSN 1600-065X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30565247> >.
- 55 CHAPEL, H. et al. Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. **Blood**, v. 112, n. 2, p. 277-86, Jul 2008. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18319398> >.
- 56 RESNICK, E. S. et al. Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades. **Blood**, v. 119, n. 7, p. 1650-7, Feb 2012. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22180439> >.
- 57 BARMETTLER, S. et al. Gastrointestinal manifestations in common variable immunodeficiency (CVID) are associated with an altered immunophenotype including B- and T-cell dysregulation. **J Allergy Clin Immunol Pract**, v. 8, n. 4, p. 1436-1438.e1, 04 2020. ISSN 2213-2201. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31704440> >.
- 58 PESCADOR RUSCHEL, M. A.; VAQAR, S. Common Variable Immunodeficiency. In: (Ed.). **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

- 59 SALZER, U.; UNGER, S.; WARNATZ, K. Common variable immunodeficiency (CVID): exploring the multiple dimensions of a heterogeneous disease. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1250, p. 41-9, Feb 2012. ISSN 1749-6632. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22300655> >.
- 60 KOKRON, C. M. et al. Clinical and laboratory aspects of common variable immunodeficiency. **An Acad Bras Cienc**, v. 76, n. 4, p. 707-26, Dec 2004. ISSN 0001-3765 (Print)0001-3765. Disponível em: < <http://dx.doi.org/S0001-37652004000400007> >.
- 61 ABBAS AK, L. A., PILLAI S. **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: 2018.
- 62 AMERATUNGA, R. et al. Comparison of diagnostic criteria for common variable immunodeficiency disorder. **Front Immunol**, v. 5, p. 415, 2014. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25309532> >.
- 63 BARSOTTI, N. S. et al. IL-10-Producing Regulatory B Cells Are Decreased in Patients with Common Variable Immunodeficiency. **PLoS One**, v. 11, n. 3, p. e0151761, 2016. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26991898> >.
- 64 BLANCO, E. et al. Defects in memory B-cell and plasma cell subsets expressing different immunoglobulin-subclasses in patients with CVID and immunoglobulin subclass deficiencies. **J Allergy Clin Immunol**, v. 144, n. 3, p. 809-824, 09 2019. ISSN 1097-6825. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30826363> >.
- 65 MOUILLOT, G. et al. B-cell and T-cell phenotypes in CVID patients correlate with the clinical phenotype of the disease. **J Clin Immunol**, v. 30, n. 5, p. 746-55, Sep 2010. ISSN 1573-2592. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20437084> >.
- 66 WARNATZ, K.; SCHLESIER, M. Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. **Cytometry B Clin Cytom**, v. 74, n. 5, p. 261-71, Sep 2008. ISSN 1552-4957. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18561200> >.

- ⁶⁷ SAIKIA, B.; GUPTA, S. Common Variable Immunodeficiency. **Indian J Pediatr**, Feb 2016. ISSN 0973-7693. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26868026> >.
- ⁶⁸ ROSKIN, K. M. et al. IgH sequences in common variable immune deficiency reveal altered B cell development and selection. **Sci Transl Med**, v. 7, n. 302, p. 302ra135, Aug 2015. ISSN 1946-6242. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26311730> >.
- ⁶⁹ GILTIAY, N. V.; GIORDANO, D.; CLARK, E. A. The Plasticity of Newly Formed B Cells. **J Immunol**, v. 203, n. 12, p. 3095-3104, 12 2019. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31818922> >.
- ⁷⁰ PIQUERAS, B. et al. Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects. **J Clin Immunol**, v. 23, n. 5, p. 385-400, Sep 2003. ISSN 0271-9142. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14601647> >.
- ⁷¹ PATUZZO, G. et al. Immunophenotypic Analysis of B Lymphocytes in Patients with Common Variable Immunodeficiency: Identification of CD23 as a Useful Marker in the Definition of the Disease. **ISRN Immunology**, v. 2013, p. 512527, 2013/04/04 2013. ISSN xxxx-xxxx. Disponível em: < <https://doi.org/10.1155/2013/512527> >.
- ⁷² AHN, S.; CUNNINGHAM-RUNDLES, C. Role of B cells in common variable immune deficiency. **Expert Rev Clin Immunol**, v. 5, n. 5, p. 557-64, Sep 2009. ISSN 1744-8409. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20477641> >.
- ⁷³ YAZDANI, R. et al. Comparison of various classifications for patients with common variable immunodeficiency (CVID) using measurement of B-cell subsets. **Allergol Immunopathol (Madr)**, v. 45, n. 2, p. 183-192, 2017 Mar - Apr 2017. ISSN 1578-1267. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27717724> >.

- ⁷⁴ CASTIGLI, E. et al. Transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor (TACI) enhances CD40 driven plasma cell differentiation. **J Allergy Clin Immunol**, v. 120, n. 4, p. 885-91, Oct 2007. ISSN 0091-6749 (Print)1097-6825 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2007.06.012> >.
- ⁷⁵ HAN, Y.; LIU, D.; LI, L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. **Am J Cancer Res**, v. 10, n. 3, p. 727-742, 2020. ISSN 2156-6976. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32266087> >.
- ⁷⁶ RIELLA, L. V. et al. Role of the PD-1 pathway in the immune response. **Am J Transplant**, v. 12, n. 10, p. 2575-87, Oct 2012. ISSN 1600-6143. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22900886> >.
- ⁷⁷ ZACCA, E. R. et al. PD-L1. **Front Immunol**, v. 9, p. 2241, 2018. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30327652> >.
- ⁷⁸ UENO, H.; BANCHEREAU, J.; VINUESA, C. G. Pathophysiology of T follicular helper cells in humans and mice. **Nat Immunol**, v. 16, n. 2, p. 142-52, Feb 2015. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25594465> >.
- ⁷⁹ KAWAMOTO, S. et al. The inhibitory receptor PD-1 regulates IgA selection and bacterial composition in the gut. **Science**, v. 336, n. 6080, p. 485-9, Apr 2012. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22539724> >.
- ⁸⁰ CUBAS, R. A. et al. Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. **Nat Med**, v. 19, n. 4, p. 494-9, Apr 2013. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23475201> >.
- ⁸¹ LEONARD, W. J.; WAN, C. K. IL-21 Signaling in Immunity. **F1000Res**, v. 5, 2016. ISSN 2046-1402. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26966515> >.

- ⁸² SOLAYMANI-MOHAMMADI, S.; ECKMANN, L.; SINGER, S. M. Interleukin (IL)-21 in Inflammation and Immunity During Parasitic Diseases. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 9, p. 401, 2019. ISSN 2235-2988. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31867283> >.
- ⁸³ WU, Y. et al. The Biological Effects of IL-21 Signaling on B-Cell-Mediated Responses in Organ Transplantation. **Front Immunol**, v. 7, p. 319, 2016. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27602031> >.
- ⁸⁴ BORTE, S. et al. Interleukin-21 restores immunoglobulin production ex vivo in patients with common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. **Blood**, v. 114, n. 19, p. 4089-98, Nov 2009. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19738033> >.
- ⁸⁵ DESJARDINS, M. et al. Modulation of the Interleukin-21 Pathway with Interleukin-4 Distinguishes Common Variable Immunodeficiency Patients with More Non-infectious Clinical Complications. **J Clin Immunol**, v. 38, n. 1, p. 45-55, 01 2018. ISSN 1573-2592. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29103189> >.